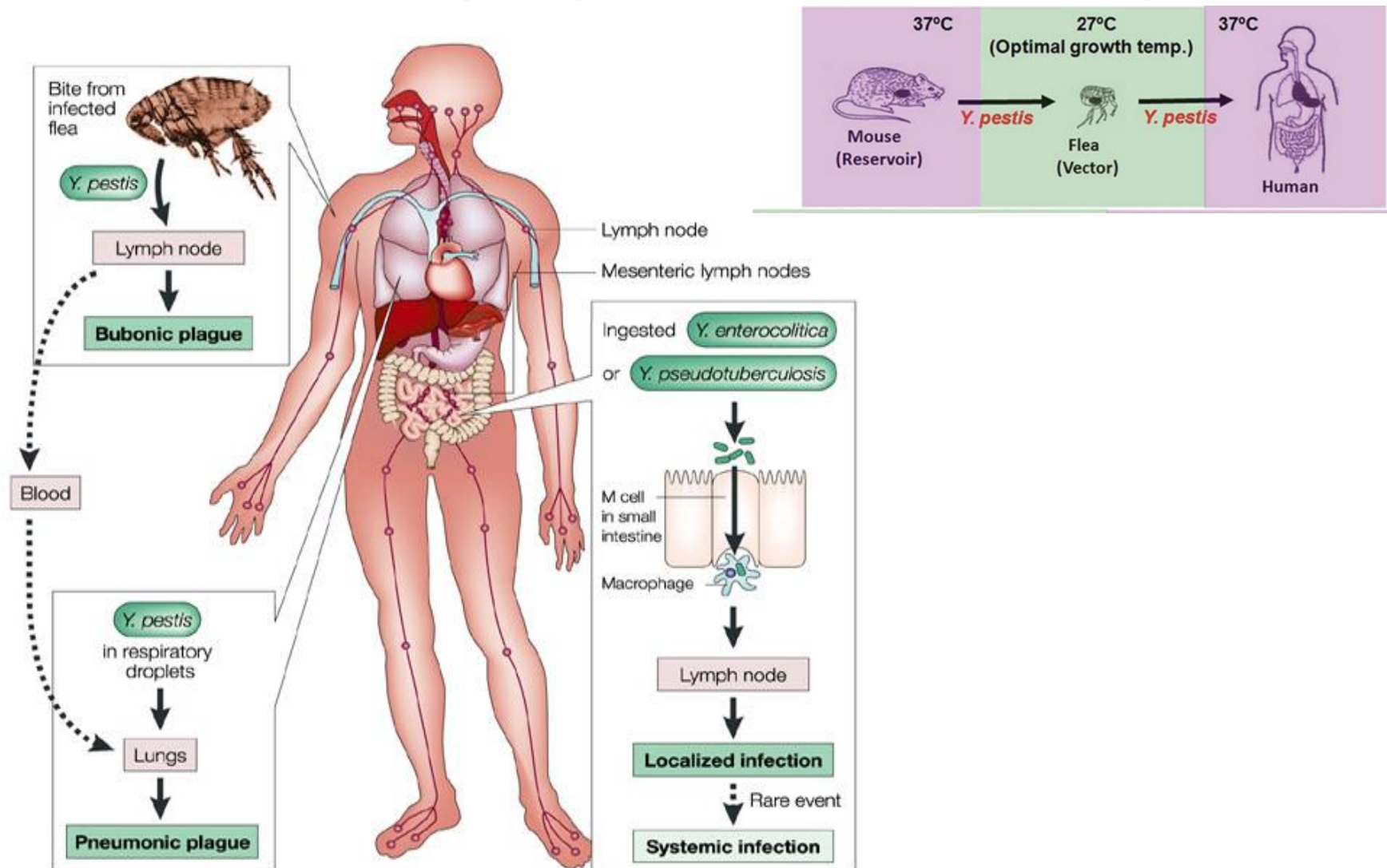
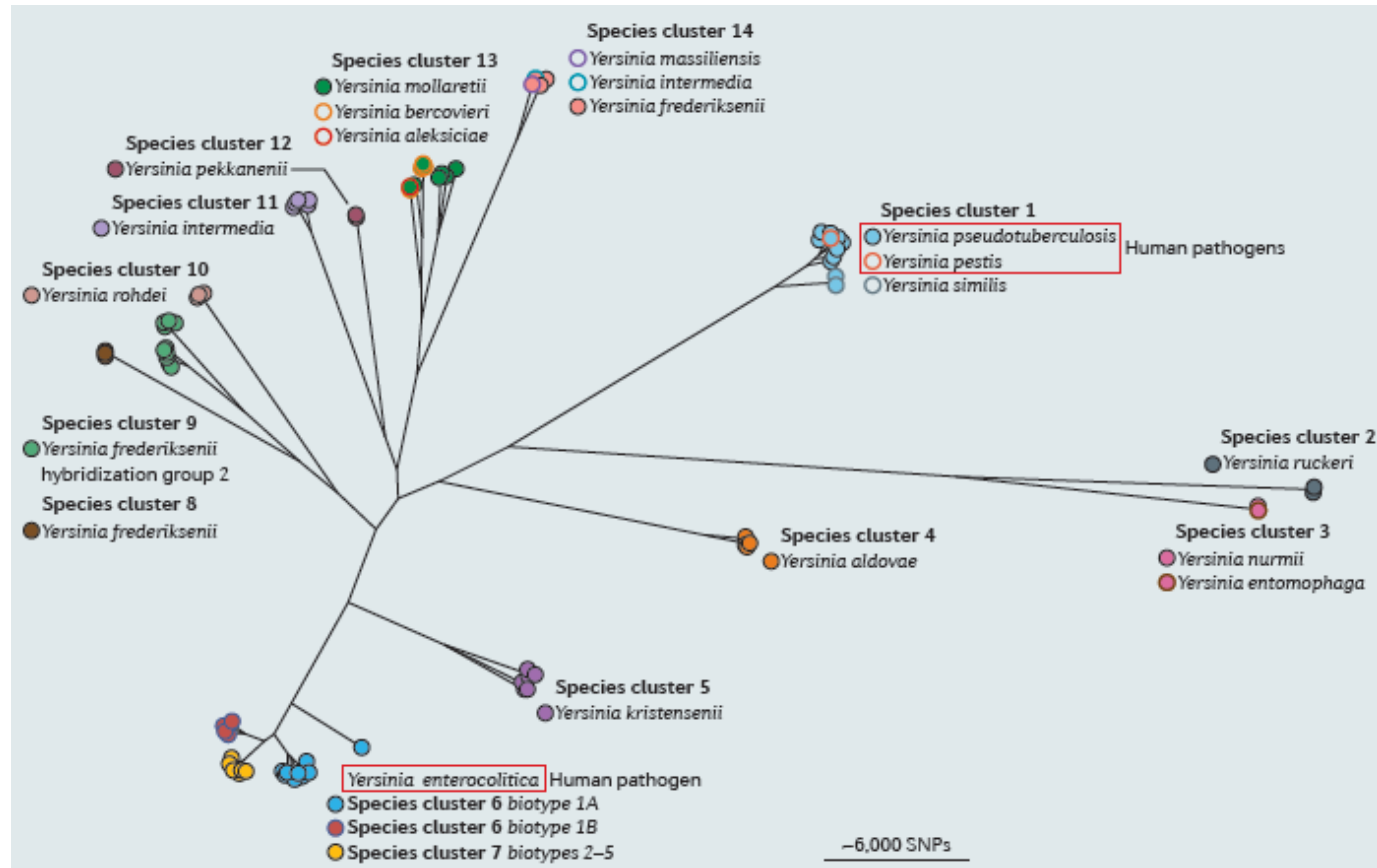


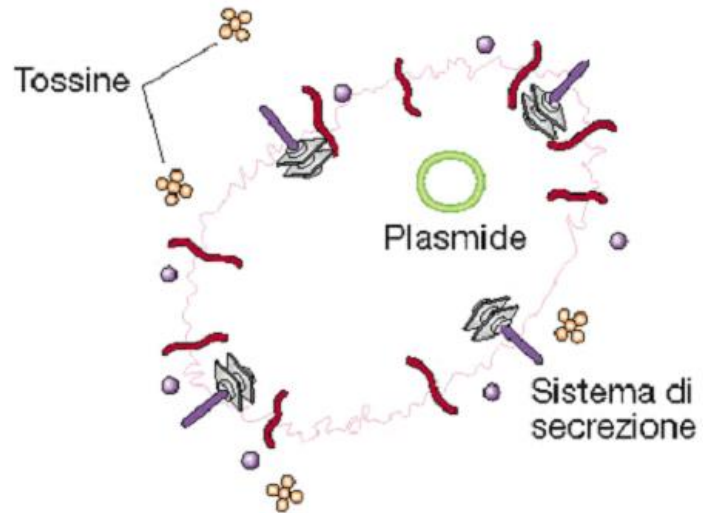
Y. pestis, persa la capacità di vivere nell'ambiente esterno, prospera tra mammiferi e pulci



Le specie patogene per l'uomo formano due rami separati agli opposti dell'albero evolutivo di *Yersinia*



L'evoluzione di *Yersinia pestis*, un paradigma del ruolo dei plasmidi



I plasmidi possono contenere geni per i sistemi di secrezione, per adesine, per tossine e in un sol colpo permettono al batterio di colonizzare una nuova nicchia.

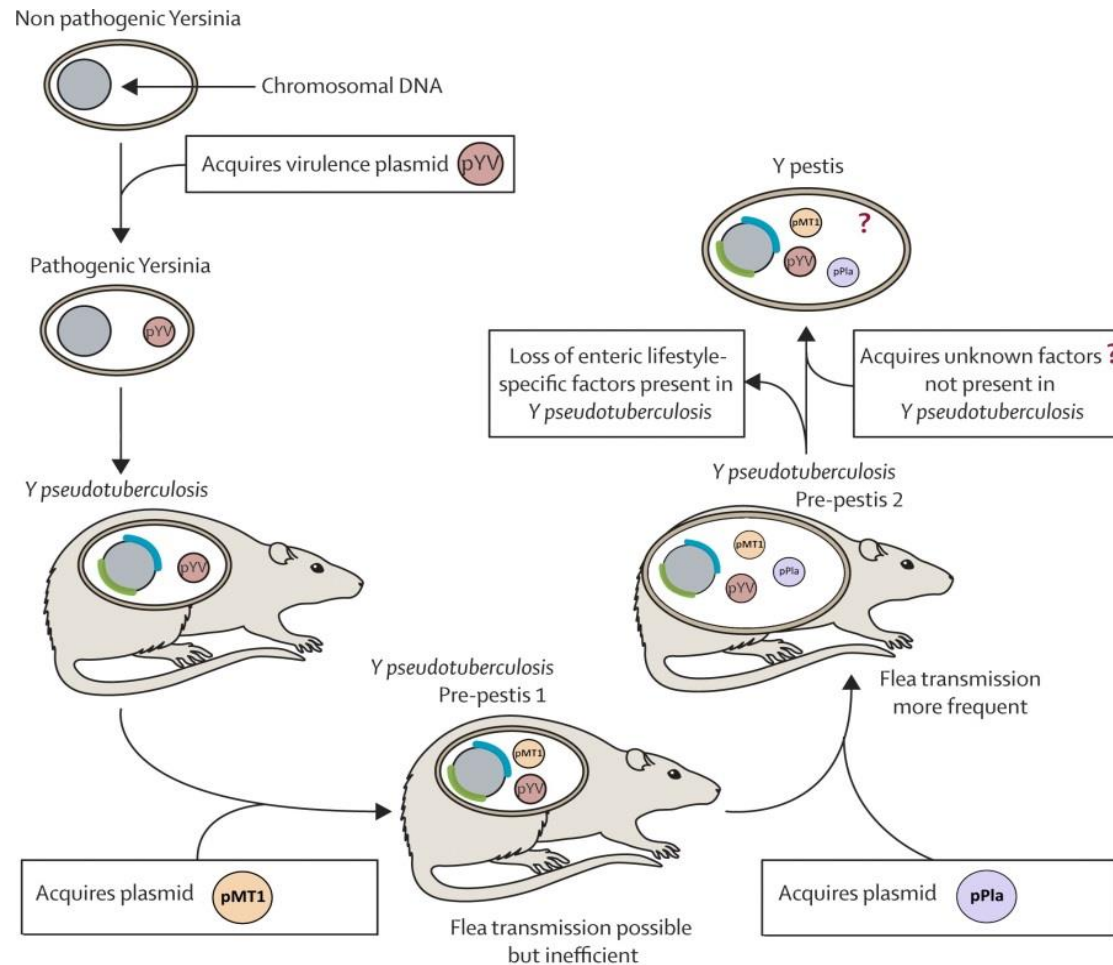
Plasmidi importanti per la virulenza di *Y. pestis*

La sequenza genomica del ceppo CO92 di *Y. pestis*, rivela la presenza di un cromosoma di 4.65 Mb e di tre plasmidi: *pYV* di 70.3 kb, *pMT1* di 96.2 kb e *pPla* di 9.6 kb

Nome del plasmide	Dimensioni (kb)	Fattori di virulenza	Ruolo nella malattia
Plasmide di virulenza <i>Yersinia</i> , <i>pYV</i>	70.3	Sistema di secrezione di tipo III, Yops	Evasione del sistema immunitario, tossicità
Plasmide con la tossina murina, <i>pMT1</i>	96.2	Tossina murina (PLD), capsula F1	Trasmissione batterica nelle pulci
Plasmide con l'attivatore del plasminogeno, <i>pPla</i>	9.6	Attivatore del plasminogeno	Diffusione dal sito di morso della pulce

L'acquisizione di plasmidi è un elemento chiave dell'evoluzione di *Y. pestis*

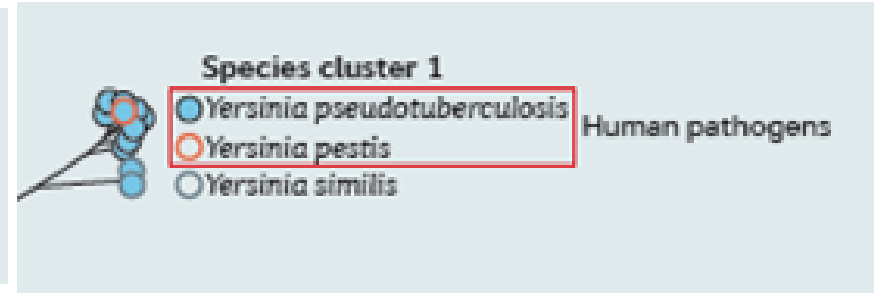
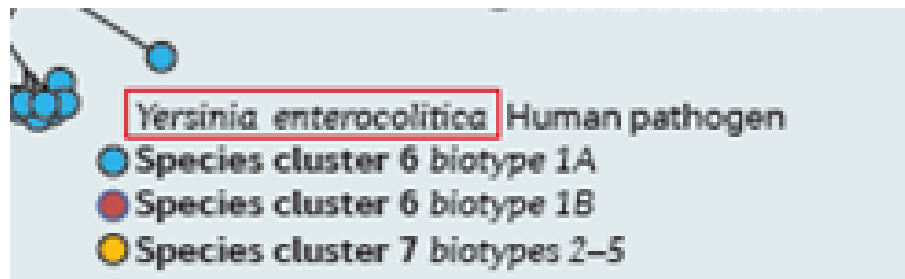
La storia evolutiva di *Y. pestis* dimostra come pochi cambiamenti genetici possano alterare le modalità di infezione e trasmissione, e come la perdita di geni sia critica tanto quanto l'acquisizione di materiale genico nel processo evolutivo



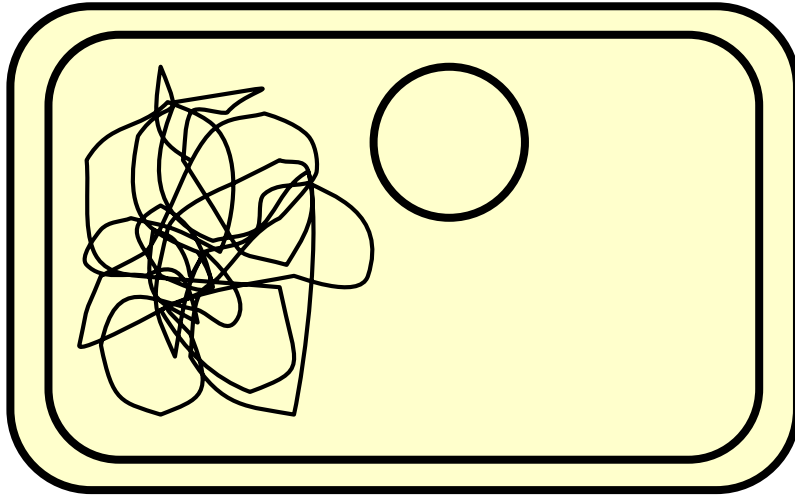
Le relazioni tra *Y. enterocolitica* e *Y. pestis*-*Y.pseudotuberculosis* sono state comprese solo recentemente.

Inizialmente infatti si pensava che la separazione tra *Y.enterocolitica* e *Y. pestis*-*Y. pseudotuberculosis* fosse avvenuta dopo l'acquisizione del plasmide pYV e che quindi esistesse un progenitore comune con il pYV per tutte e tre le specie

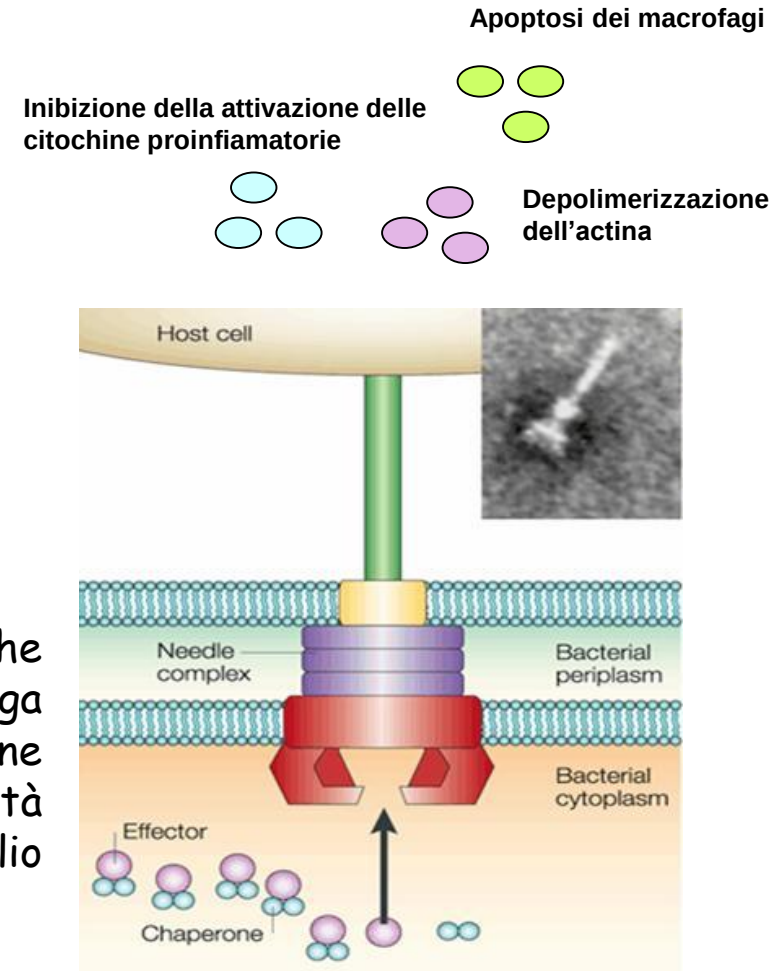
Invece uno studio filogenetico più accurato ha permesso di osservare che versioni simili del plasmide di virulenza pYV sono state acquisite indipendentemente almeno 3 volte : 2 volte nella linea di *Y. enterocolitica* che presenta più di un cluster ed una volta nella linea *Y.pestis/Y.pseudotuberculosis*



Arriva il primo plasmide ...



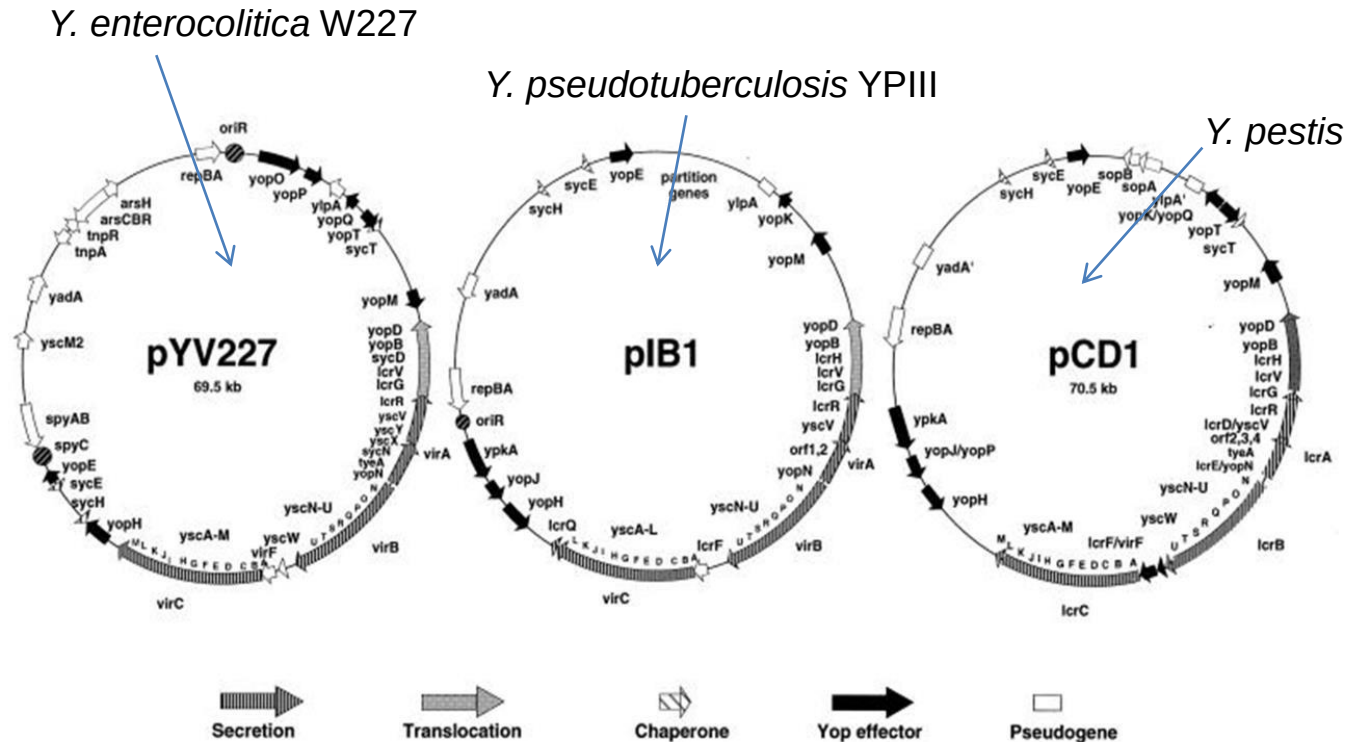
Il plasmide pYV è un grande plasmide (70 kb) che contiene i geni per la sintesi di una "siringa molecolare" in grado di iniettare proteine plasmidiche capaci di distruggere la funzionalità della cellula bersaglio



Il plasmide *pYV*

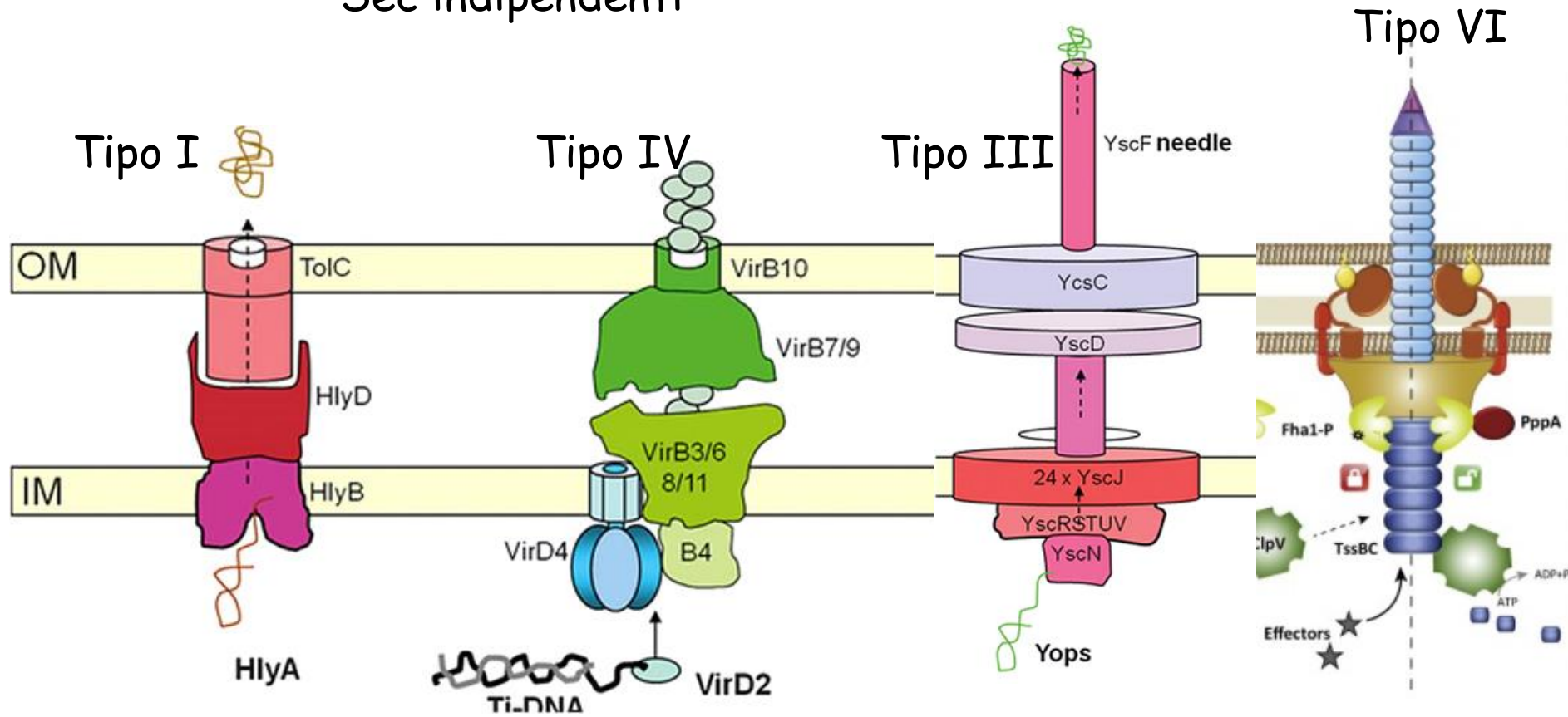
Il plasmide *pYV* (*Yersinia virulence*) è presente in tutti i ceppi di *Yersinia* patogeni e codifica

- un sistema di secrezione di tipo III e
- dei fattori proteici che interferiscono con la risposta immunitaria nell'ospite.



Codifica per alcune proteine chiamate **Yops** (*Yersinia outer membrane proteins*). Il rilascio delle Yops nelle cellule del sistema immunitario inibisce la polimerizzazione dell'actina, prevenendo la fagocitosi delle cellule batteriche e sopprime la trascrizione dei geni per la risposta immune. La diminuita espressione delle citochine proinfiammatorie favorisce la proliferazione dell'infezione.

Secrezione delle proteine in una singola tappa Sec indipendenti



Protein secretion by the 1-step mechanism. The hemolysin system, a Type 1 secretion system, consists of the ABC transporter HlyB, the adaptor protein HlyD, and the outer membrane component TolC (left). The Ti-plasmid is a Type 4 secretion system of *Agrobacterium tumefaciens* (middle). Type3 Secretion System adopted by many pathogenic bacteria and Type VI .

Sistema di secrezione di Tipo III

- Non coinvolge il sistema Sec per attraversare I.M.
- Permette di inoculare fattori di virulenza direttamente in cellule animali o vegetali
- Dotati di una struttura complessa a siringa
- Hanno omologia strutturale con alcuni componenti del flagello
- Trasportano proteine che costituiscono l'apparato stesso e proteine di regolazione del processo di secrezione stesso
- Presenti in batteri patogeni quali Shigella, Salmonella, Yersinia

Il sistema Ysc-Yop

Il sistema di secrezione di Tipo III Ysc-Yop è codificato dal plasmide di virulenza pYV e codifica per i fattori di virulenza che vengono rilasciati all'interno delle cellule del sistema immunitario.

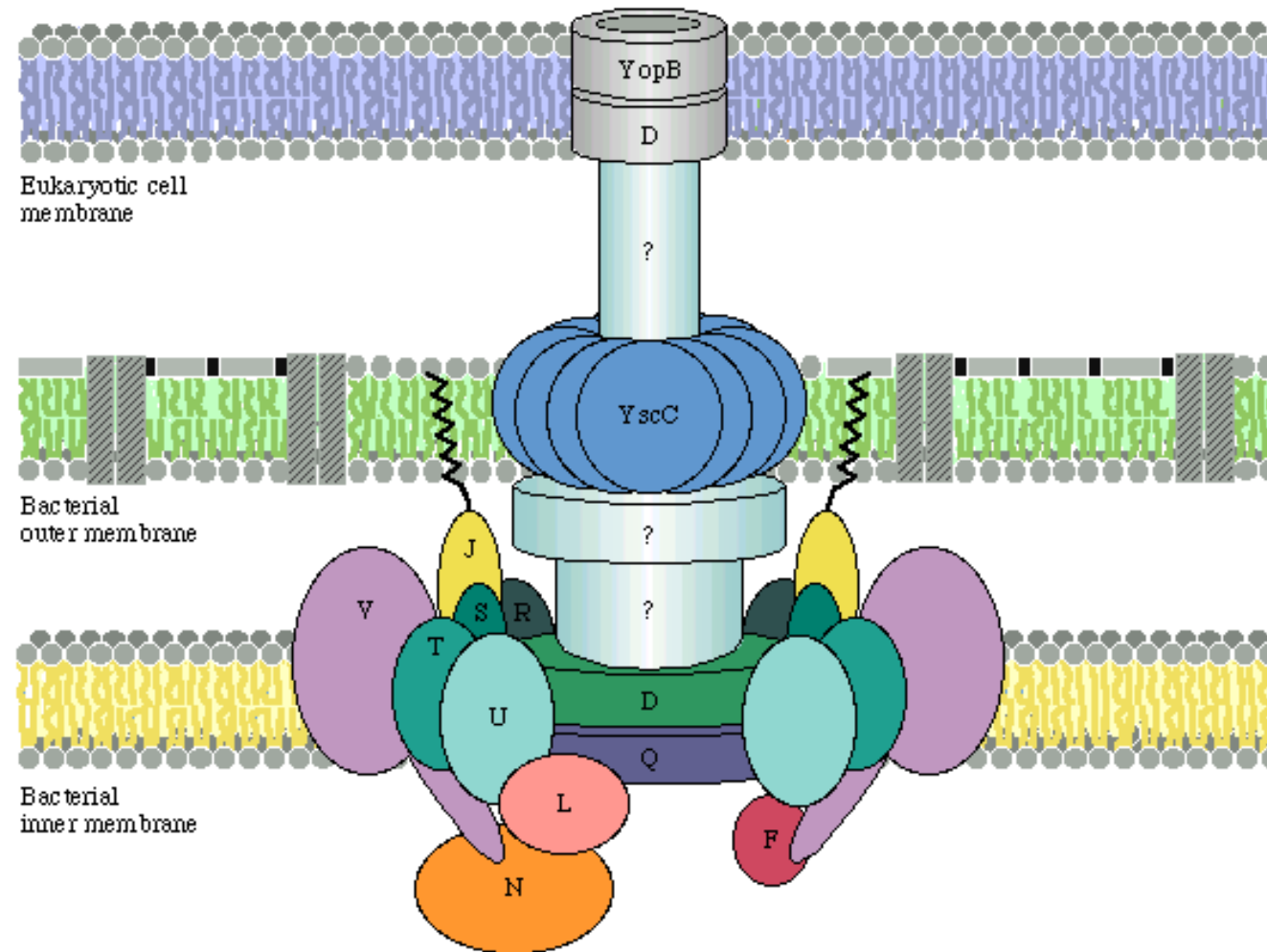
Yersinia non invade le cellule come altri batteri (*Salmonella* o *Shigella*) ma rimane allo stato extracellulare ancorata alla superficie delle cellule immunitarie.

Le proteine che vengono rilasciate dal sistema T3SS sono definiti effettori **Yops** e hanno come effetto:

- alterazione delle dinamiche del citoscheletro della cellula
- blocco del processo di fagocitosi da parte dei macrofagi e dei polimorfonucleati.
- inibizione della produzione di citochine pro-infiammatorie e di molecole di adesione:

queste azioni permettono la sopravvivenza di *Yersinia* e la sua moltiplicazione extracellulare nei tessuti linfoidei

Il sistema di esportazione di Tipo III di *Yersinia* :
elevata omologia con il TSS di *Shigella*



Quando viene sintetizzato l'iniettosoma?

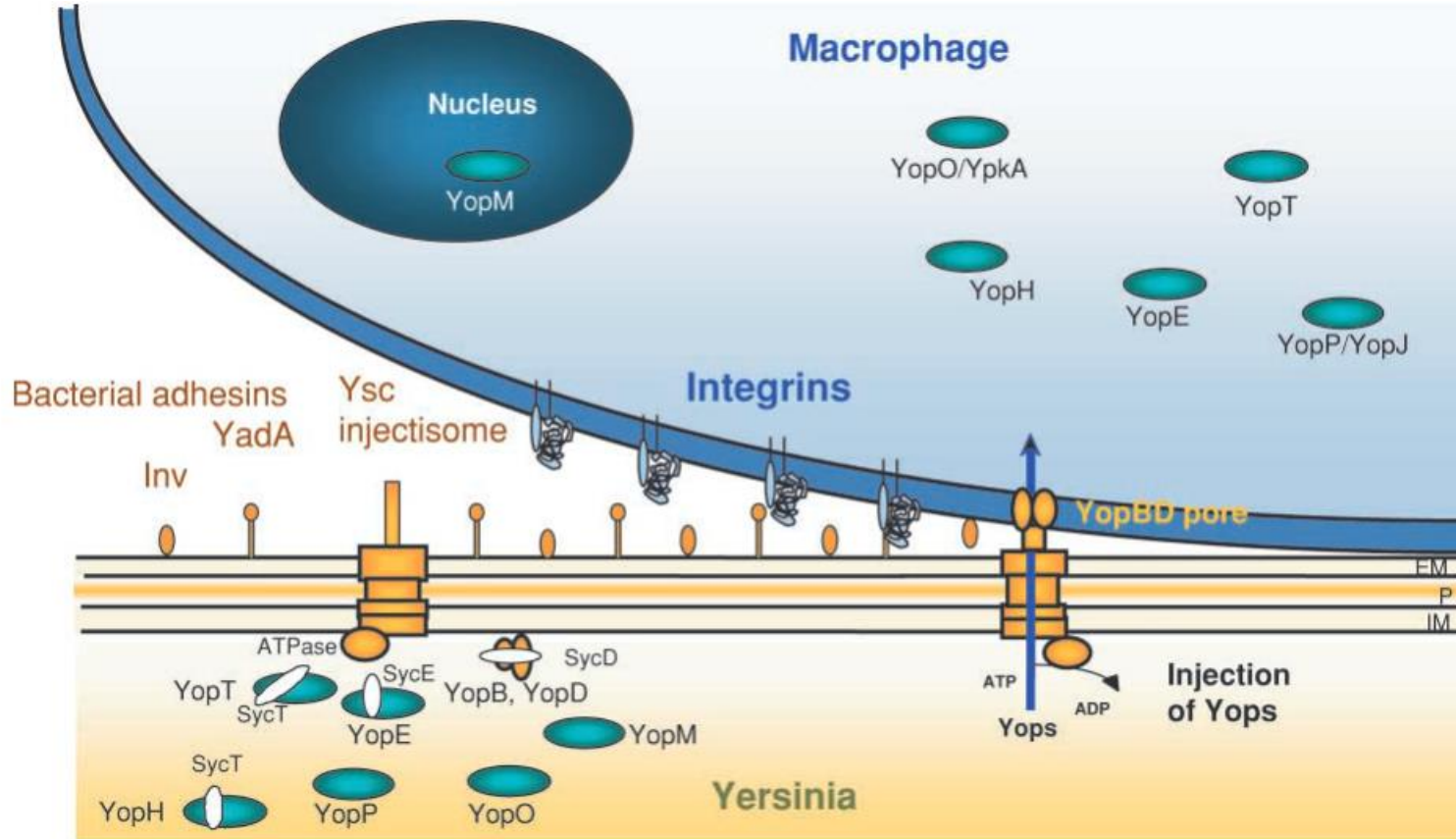


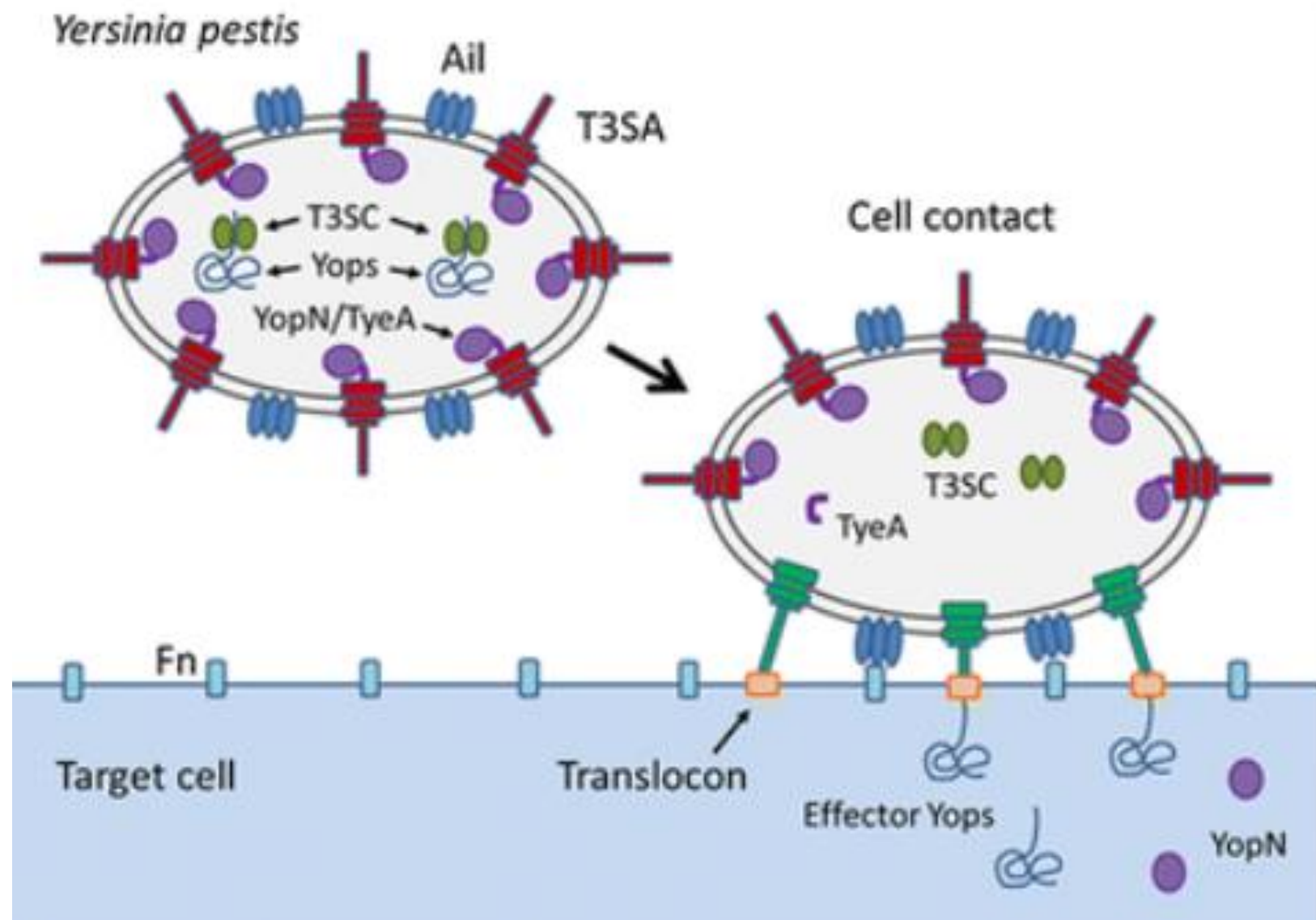
Figure 1. Secretion of Yops by the Ysc injectisome and translocation across the target cell membrane. When *Yersinia* are placed at 37°C in a rich environment, the Ysc injectisome is installed and a stock of Yop proteins is synthesized. During their intrabacterial stage, some Yops are capped with their specific Syc chaperone. Upon contact with a eukaryotic target cell, the adhesins YadA or Inv interact with integrins and the bacterium docks at the cell's surface. Then, the secretion channel opens and Yops are exported. YopB and YopD form a pore in the target cell plasma membrane, and the effector Yops are translocated across this membrane into the eukaryotic cell cytosol. YopM migrates to the nucleus. EM, outer membrane; P, peptidoglycan; IM, plasma membrane.

La sintesi delle proteine dell'iniettosoma ha inizio alla temperatura dell'ospite ma le proteine sono ricoperte da specifiche chaperonine (Syc).

Quando avviene il contatto con le cellule bersaglio, le proteine Inv e/o l'adesina YadA* interagiscono con le integrine agganciando il batterio alla superficie cellulare. A quel punto il canale dell'iniettosoma viene aperto e le proteine traslocate nel citoplasma della cellula ospite. YopM va nel nucleo.

**YadA non è presente in Y.pestis ma sono in Y.pseudotuberculosis/Y.enterica che infettano cellula epiteliali*

Il sistema di Tipo III viene anche definito iniettosoma o siringa molecolare



Quali sono i componenti di base del sistema T3SS Ysc-Yop?

Il sistema Ysc-Yop è costituito dalle

- Proteine Ysc (**Yop secretion system**) che formano l'apparato
- Proteine Yop (**Yersinia outer proteins**) che sono secrete dall'apparato Ysc

Fattori Yop importanti

3 Yops:

YpoB

YopD

LcrV

Traslocatori :

traslocano gli effettori attraverso la membrana della cellula target formando il poro

6 Yops:

YopH

YopE

YopT

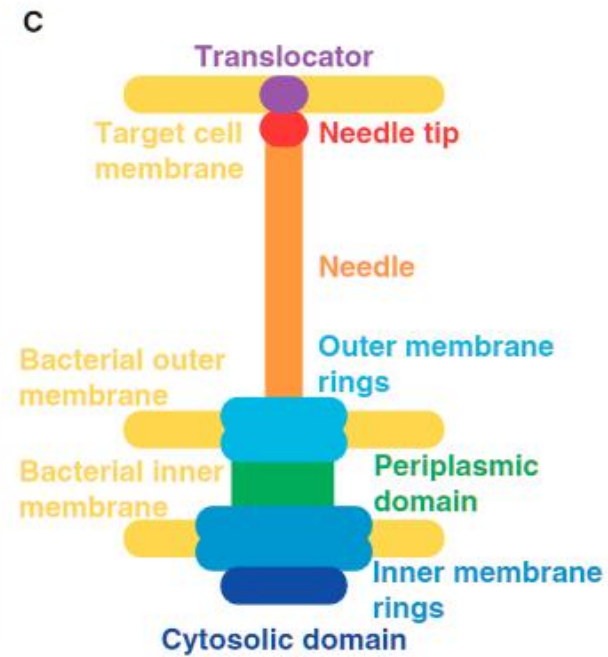
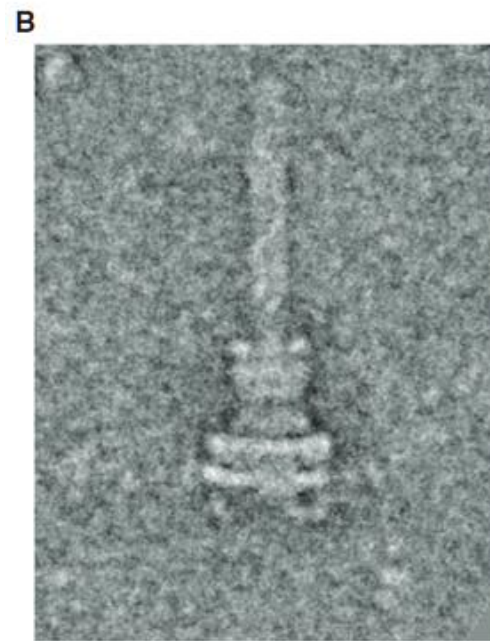
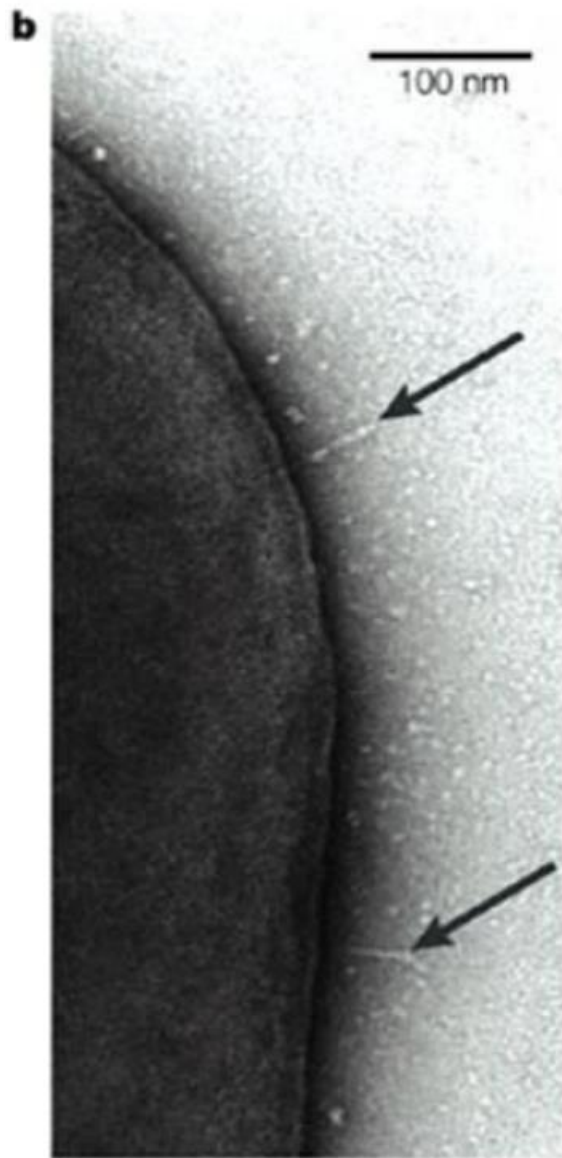
YopO(YpkA)

YopP (YopJ)

YopM

Effettori :

contribuiscono al blocco della fagocitosi alterando la struttura del citoscheletro

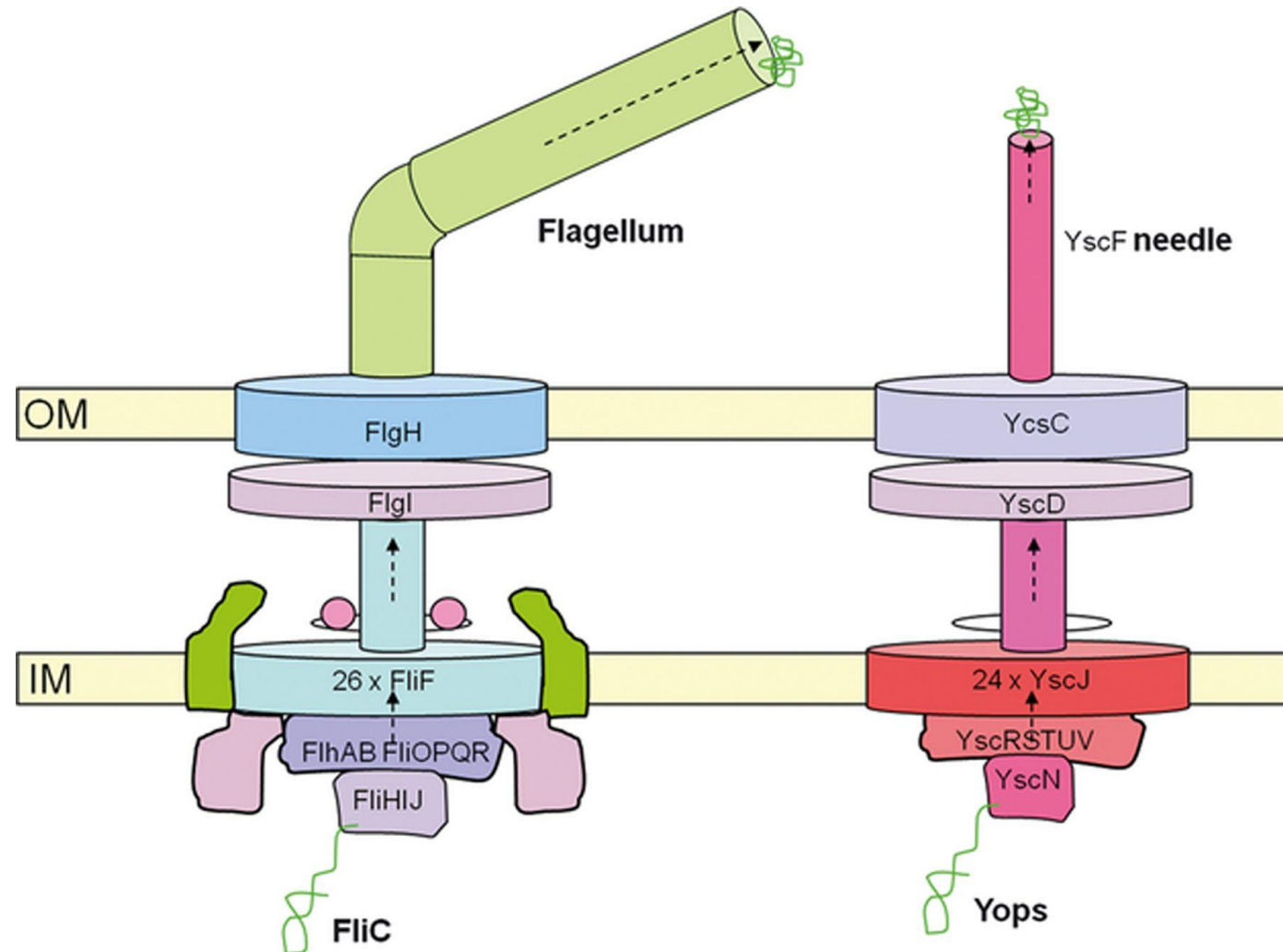


Prima del contatto con la cellula ospite *Yersinia*, se incubata alla temperatura dell'ospite è in grado di sintetizzare molte copie dell'apparato di secrezione di tipo III.

Questo organello è costituito da:

- Corpo basale che attraversa lo strato di peptidoglicano e le due membrane e
- una struttura ad ago che si protende al di fuori del batterio con un diametro di circa 20°.

Da un punto di vista strutturale il sistema di secrezione di tipo III mostra delle omologie con il flagello



Struttura dell'iniettosoma

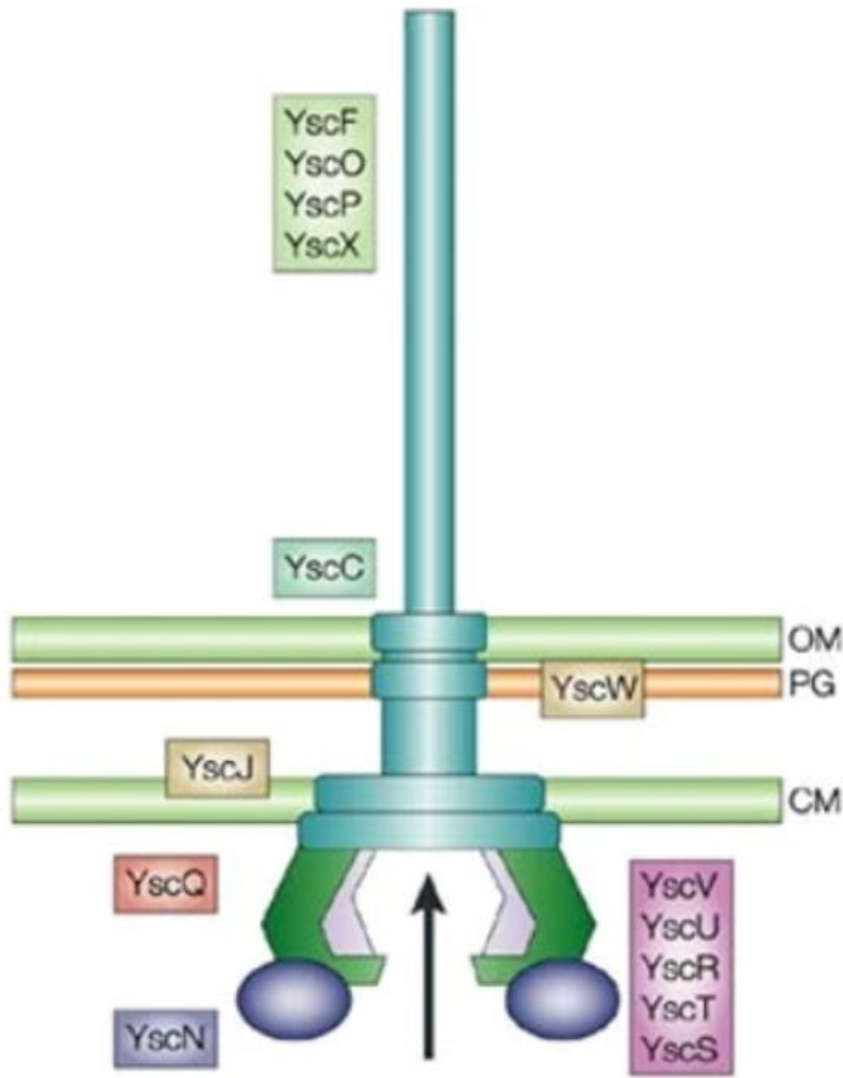


Figure 1 | **The Ysc injectisome.** **a** | Schematic representation of the Ysc injectisome spanning the outer membrane (OM), the peptidoglycan layer (PG) and the cytoplasmic membrane (CM) of the bacterium. The ring spanning the OM is made of the secretin YscC, assisted by the lipoprotein YscW. YscJ is another lipoprotein. YscF, YscO, YscP and YscX are external parts of the injectisome. YscF is the main constituent of the needle. YscV, YscU, YscR, YscT and YscS are proteins of the basal body that are in contact with the CM. YscN is the ATPase of the pump. YscQ is probably localized to the large inner cylinder. **b** | An electron micrograph of injectisome

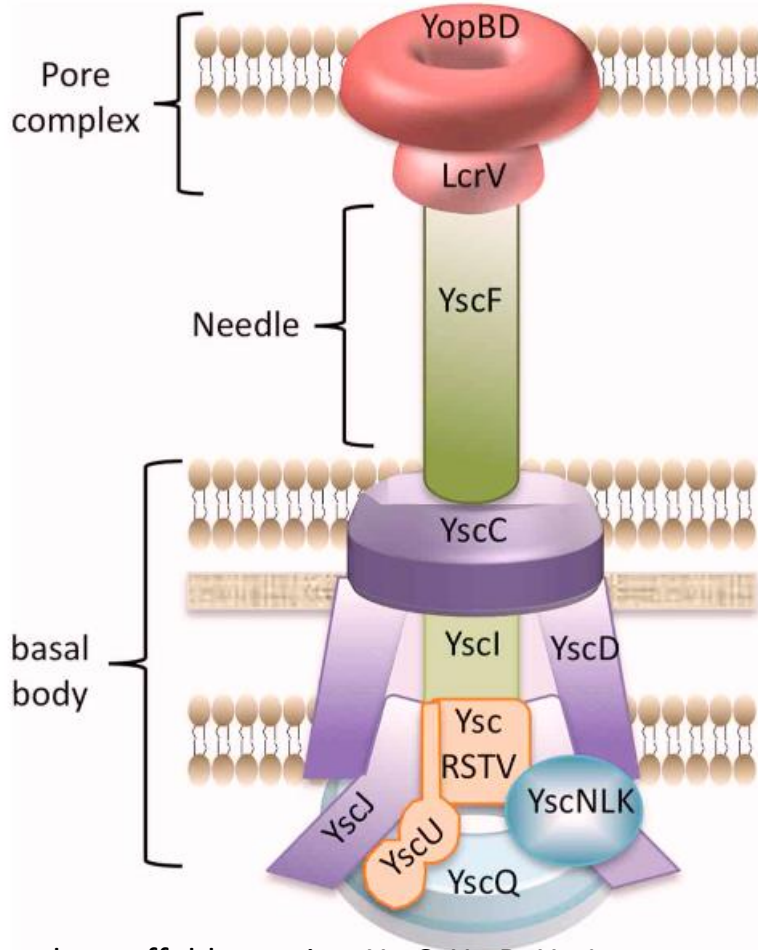
Per analogia con il flagello questa parte è costituita da un largo cilindro e da un anello che attraversa la membrana. La parte finale del corpo basale localizzata nella OM ha una forma ad anello con un foro centrale di 50° formato dalla polimerizzazione di una proteina **YscC** e termina con un ago formato da monomeri di una piccola proteina **YscF** con un poro interno più piccolo.

La parte più interna fornisce, come in altri sistemi, l'energia ed è costituita da YscN, ATPasi collegata al cilindro più interno YscQ.

In genere l'iniettosoma viene considerato come un condotto cavo tramite il quale passano le proteine esportate attraversando così in un unico step le due membrane e lo strato di peptidoglicano. Per il rilascio delle Yops all'interno della cellula bersaglio sono richieste altre tre proteine definite traslocatori YopB, YopD e LcrV. Quindi l'ago da solo non è in grado di bucare la membrana della cellula ospite ma sono richiesti i traslocatori che destabilizzano la membrana facilitando così la formazione del poro che connetterà il citoplasma batterico con quello della cellula bersaglio.

Quali sono i componenti essenziali del sistema di T3SS di *Yersinia*?

Il Sistema è costituito da oltre 15 proteine e la biogenesi di questa complessa struttura è altamente regolata con un meccanismo a cascata che coinvolge una regolazione a livello trascrizionale e posttrascrizionale.



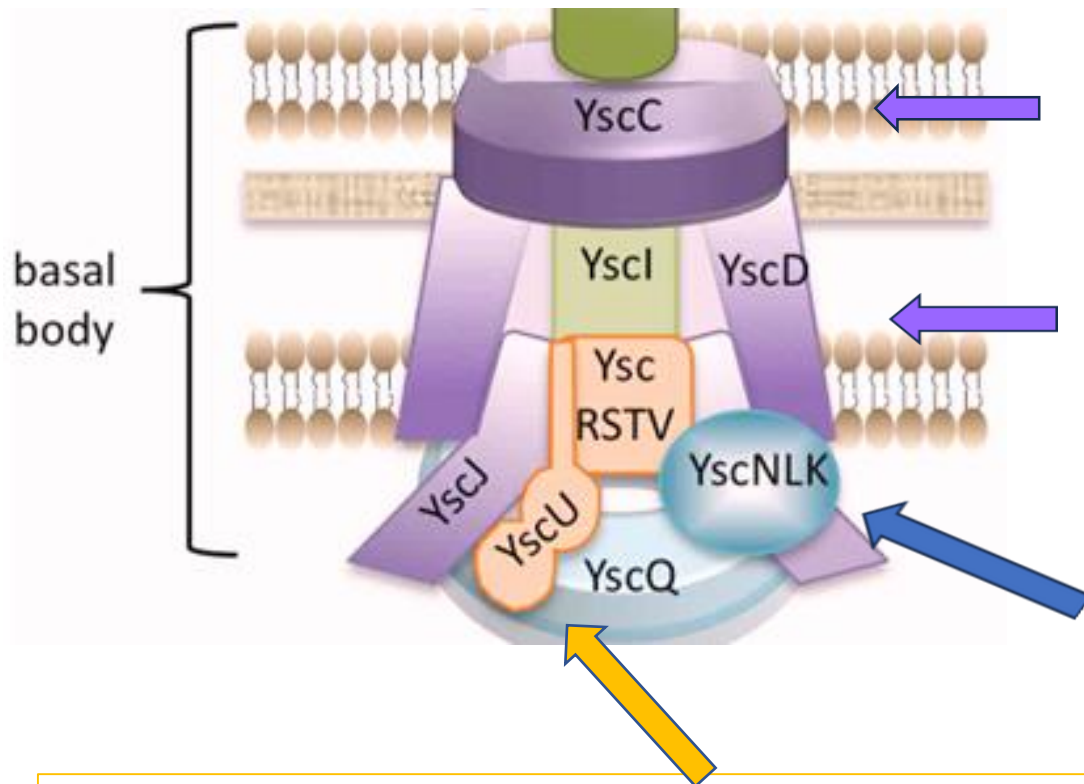
Il corpo basale è costituito da numerose proteine definite Ysc che si distribuiscono tra i diversi compartimenti cellulari. L'ago è costituito dalla proteina YscF. La parte terminale dell'ago serve come base per la formazione del complesso del poro di traslocazione costituito dalle proteine LcrV e YopBD

Per analogia con la struttura del flagello distinguiamo un anello nella membrana esterna YscC e un anello nello spazio periplasmatico YscD and YscJ e un anello nella membrana citoplasmatica YscQ. Tutte insieme queste proteine formano un' impalcatura ancorata al peptidoglicano e vengono pertanto definite "scaffold protein".

Purple, scaffold proteins: YscC, YscD, YscJ;
Orange, export apparatus proteins: YscR, YscS, YscT, YscU, YscV;
Blue, cytoplasmic components: YscQ (C-ring) and YscN, YscL, YscK (ATPase complex);
Green, YscI (rod) and YscF (needle);
Red, pore complex: LcrV (needle tip complex) and YopB/YopD (translocation pore).

Struttura del Corpo Basale

Il corpo basale è la porzione dell'iniettosoma che attraversa la membrana interna e la membrana esterna ed include proteine dell'impalcatura (scaffold) quali YscCDJ (in viola), proteine dell'apparato di esportazione come YscRSTUV(in arancione) il complesso che fornisce ATP (YscNKL in blue) e l'anello di attraversamento della membrana citoplasmatica (C ring,YscQ)



1. The basal body formation begins with oligomerization of YscC, which forms the OM ring that spans the outer membrane and extends into the periplasm. This is in contrast with the basal body of the flagellum which begins its assembly in the inner membrane and builds outward

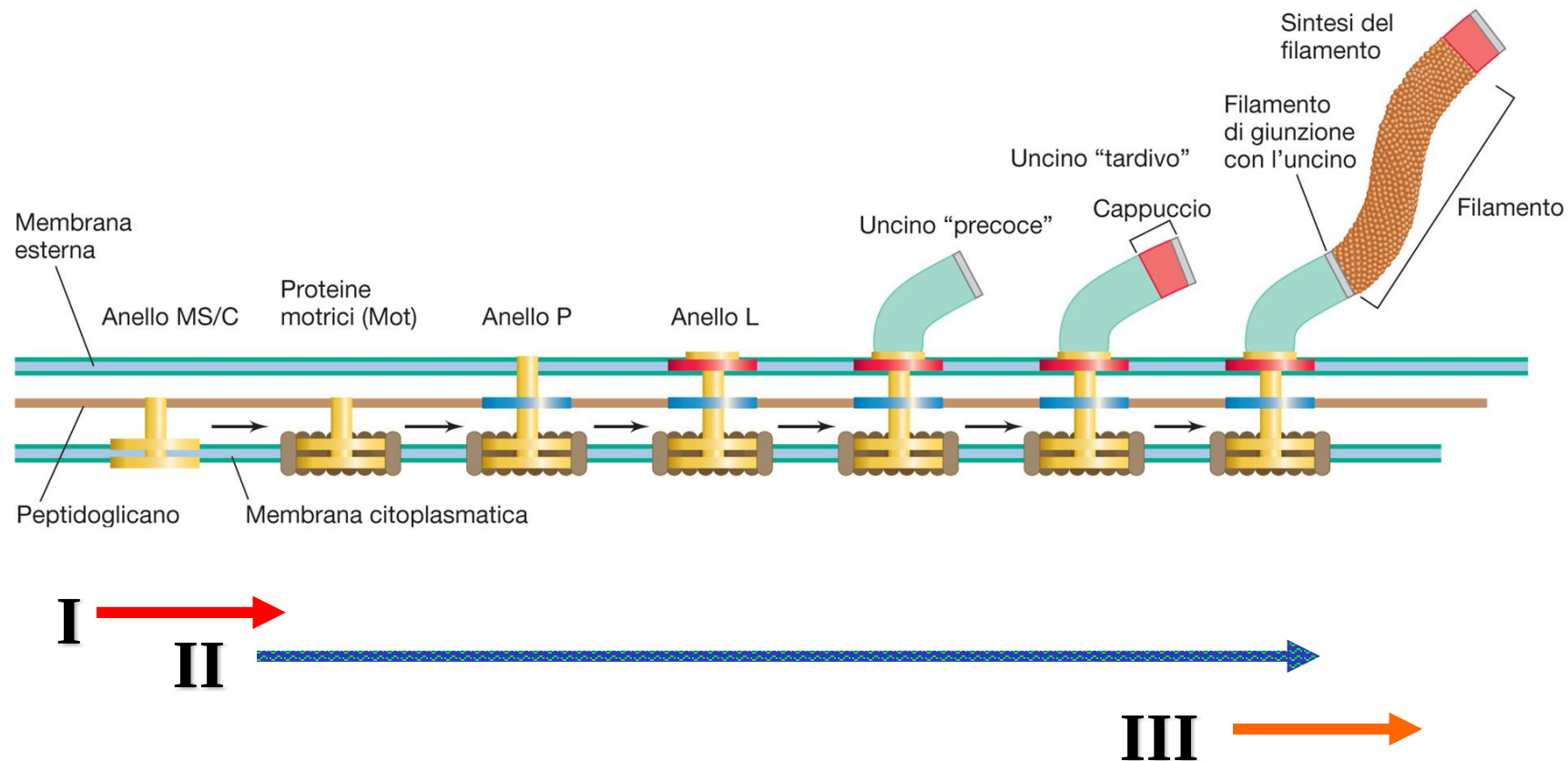
2. After the OM ring is formed, a ring of YscD is assembled in the inner membrane and is thought to connect the outer and inner membrane rings

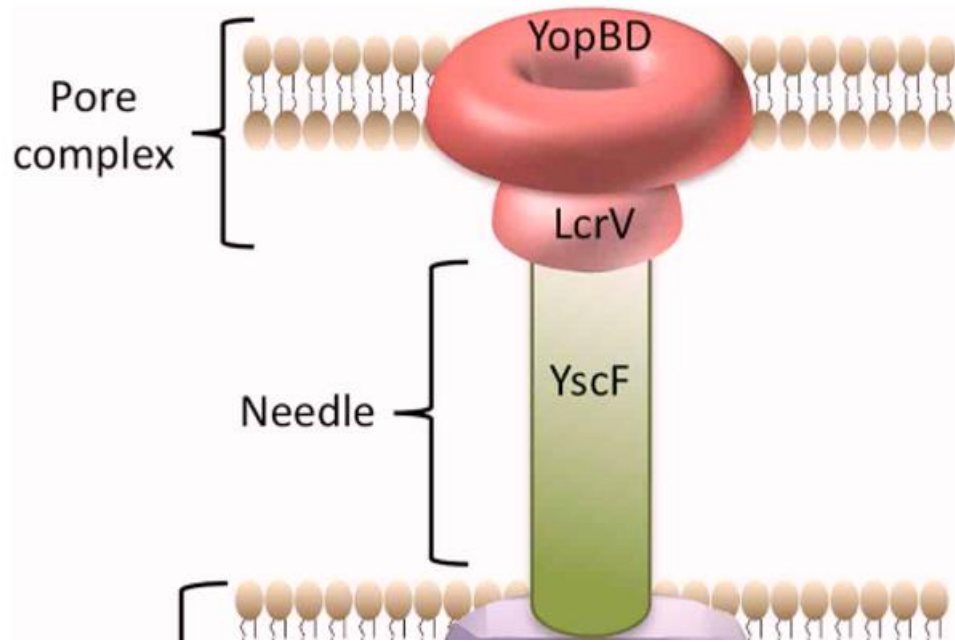
3. An ATPase complex composed of YscN, YscK, and YscL forms on the cytosolic face of the basal body. YscN is the ATPase necessary for the secretion of substrates by the T3SS. YscL is a negative regulator of ATPase activity, while the function of YscK is as yet unknown

4. L'apparato di esportazione composto dalle proteine integrali di membrana YscRSTUV si assembla all'interno della membrana interna indipendentemente dalle proteine dello scaffold

La biosintesi del flagello procede dalle strutture più interne alla cellula verso le più esterne ...

I geni coinvolti in questo processo sono molti e sono stati suddivisi in tre gruppi (I, II e III)





La formazione dell'ago e del complesso del poro sono estremamente regolati e vengono secreti in un ordine preciso a fasi così come gli effettori .

La proteina che costituisce l'ago YscF verrà esportata assieme alla proteina "righello" YscP che ne determina la lunghezza.

Successivamente passeranno la proteina della punta dell'ago LcrV e le proteine che costituiscono il poro di traslocazione (YopB e YopD). Gli effettori che entreranno nella cellula ospite saranno rilasciati solo dopo il contatto con la cellula bersaglio

Purple, scaffold proteins: YscC, YscD, YscJ;

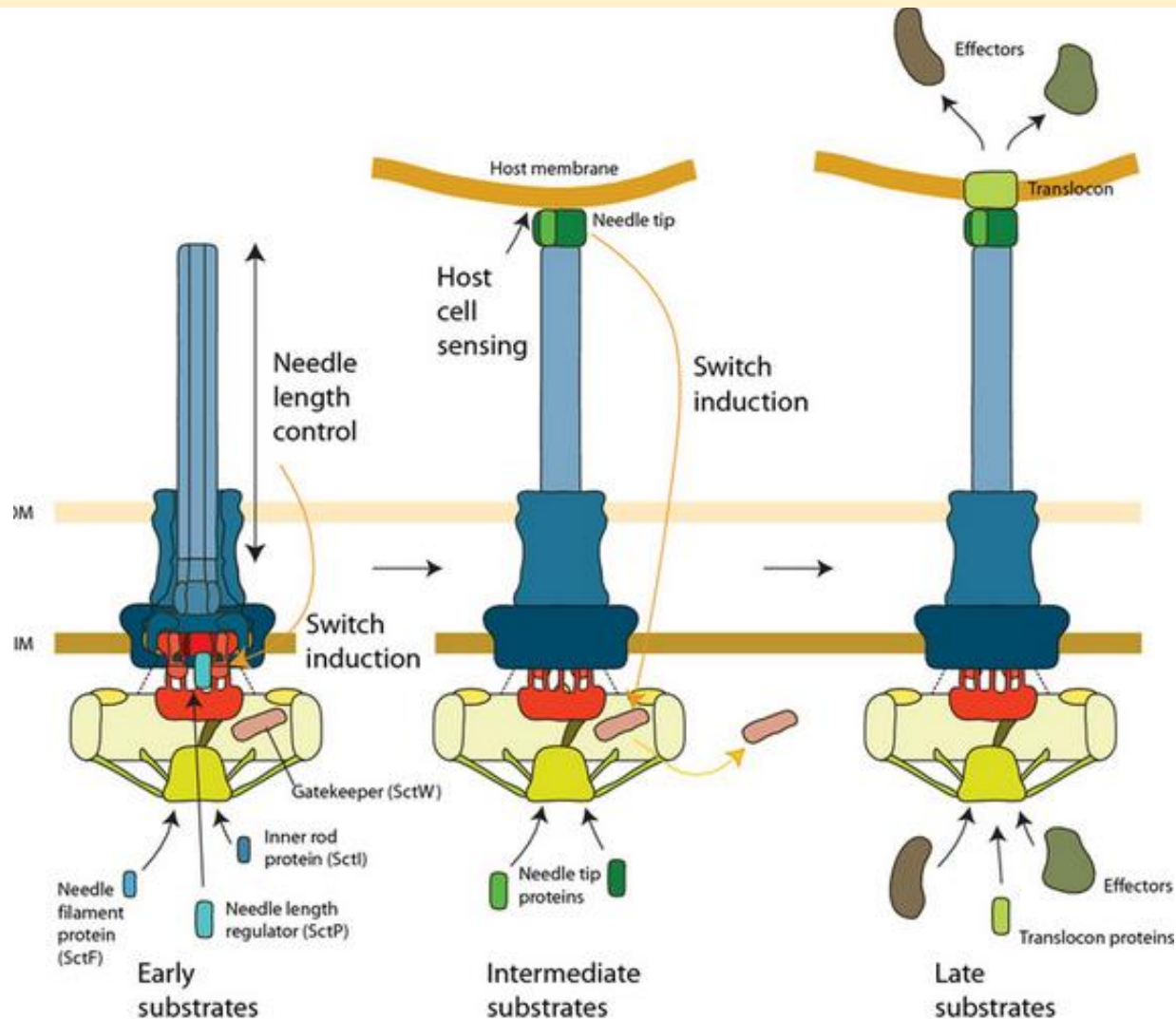
Orange, export apparatus proteins: YscR, YscS, YscT, YscU, YscV;

Blue, cytoplasmic components: YscQ (C-ring) and YscN, YscL, YscK (ATPase complex);

Green, YscI (rod) and YscF (needle);

Red, pore complex: LcrV (needle tip complex) and YopB/YopD (translocation pore).

Come avviene l'esportazione dei substrati attraverso il Sistema di tipo III?

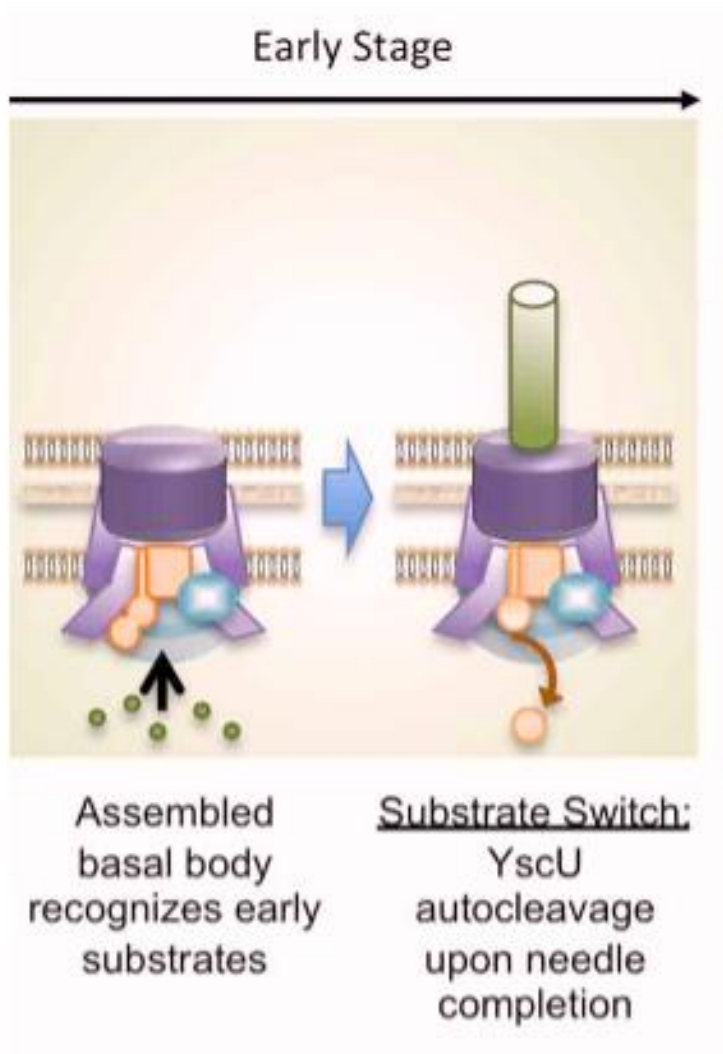


Prima che vengano traslocati gli effettori, vengono esportati i componenti più esterni dell'apparato di secrezione

Possiamo distinguere tre fasi
Early (Precoce)
Middle (Media)
Late (Tardiva)

Sintesi del T3SS e formazione del poro con la membrana eucariotica per il rilascio degli effettori nel citoplasma della cellula ospite

Early stage: l'esportazione delle proteine dell'ago



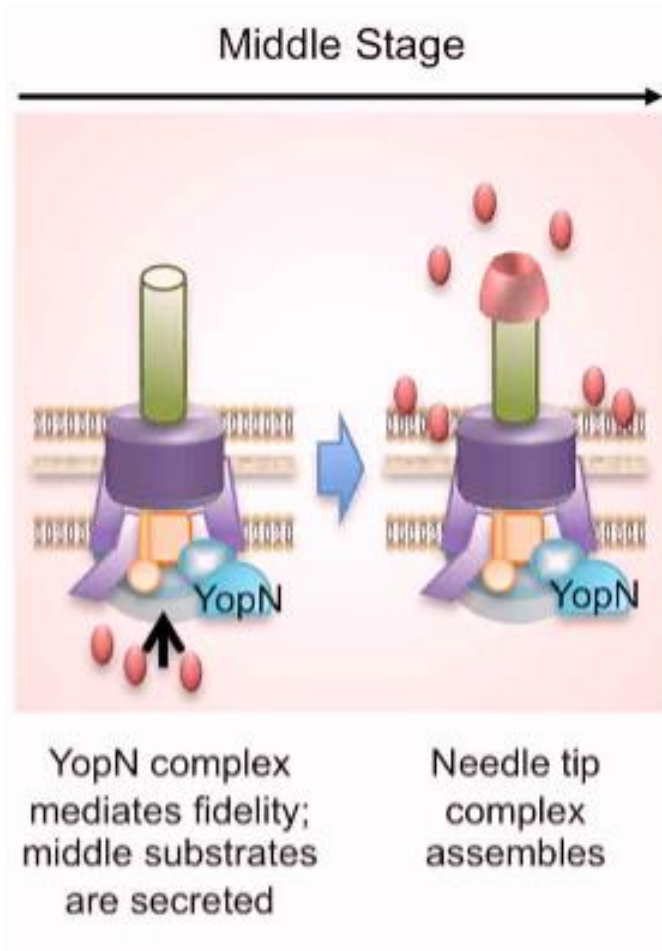
Nella fase precoce il corpo basale riconosce i substrati precoci (in verde) e li esporta. Si tratta di proteine necessarie per la formazione della parte esterna del sistema, costituita dall'ago.

Una volta assemblato l'ago, la proteina YscU (arancio) va incontro ad un autoclivaggio che fa partire il segnale per un cambio di specificità del substrato e determina la transizione alla fase intermedia.

YscU è una delle proteine dell'apparato di esportazione localizzata nel citoplasma in contatto con le proteine dello scaffold.

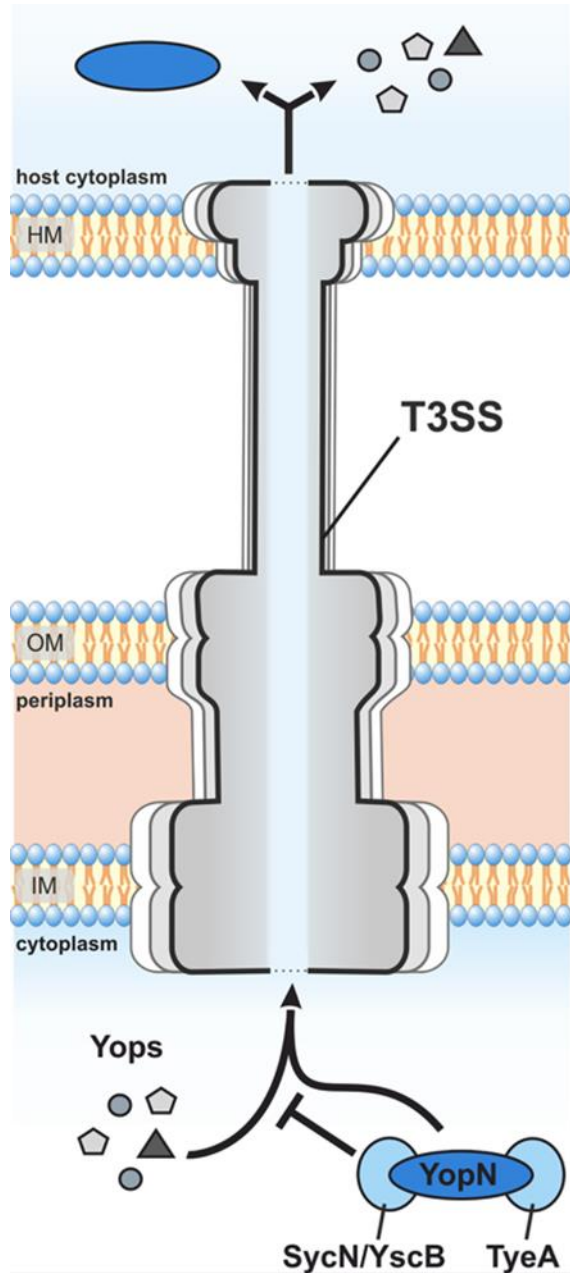
Upon completion of the basal body, proteins necessary for needle assembly can be exported. We refer to this point as the "early" stage, because only "early" substrates are translocated

Middle stage: esportazione dei substrati intermedi



Durante questa fase intermedia, la proteina YopN, si associa al corpo basale permettendo così ai substrati intermedi di essere esportati. Questi substrati sono richiesti per la formazione della punta dell'ago e il poro di traslocazione.

Una volta che il batterio entra in contatto con la cellula bersaglio YopN viene rilasciata dal corpo basale e secreta, dando così il via alla transizione alla fase tardiva.

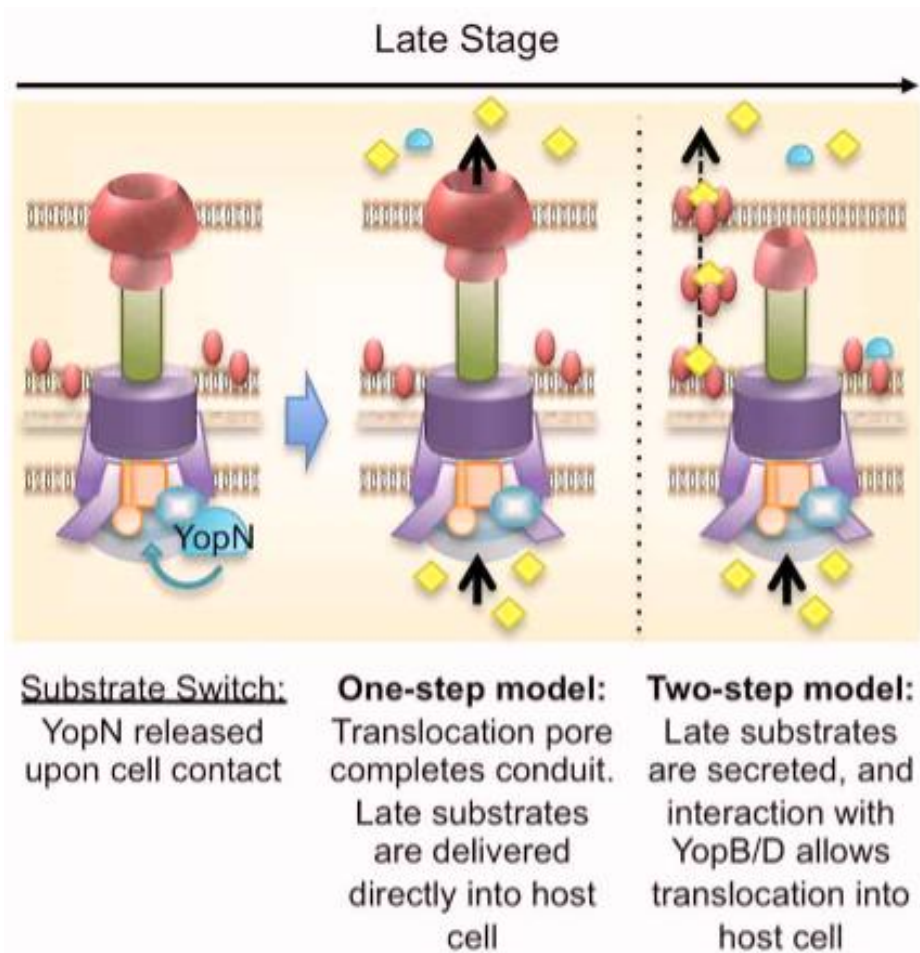


Ruolo di YopN: Blocco dell'esportazione degli effettori fino alla sua espulsione

The secretion of effector proteins (Yops) that modulate the host immune system are controlled by the YopN-TyeA-SycN-YscB complex. YopN and TyeA block secretion in concert with the chaperone complex SycN/YscB. Dissociation of the plug is assumed to occur through depletion of calcium and after host cell contact resulting in the SycN/YscB-controlled secretion of YopN itself [

HM: host membrane; OM: outer membrane; IM: inner membrane.

Late stage: il rilascio degli effettori



Per il rilascio delle protein esportate nella fase tardiva sono previsti due modelli:

1. Nel modello **One-step model**, il complesso del poro si assembla sulla punta dell'ago e i diversi substrati tardivi (in giallo) passano attraverso il poro.

Nel modello **Two-step model** i substrati tardivi (in giallo) sono rilasciati nello spazio extracellulare e solo succesivamente interagiscono con le protein del poro. I substrati insieme alle proteine del poro prendono contatto con la membrana dell'ospite e vengono poi rilasciati.

Ruolo dell'ago nelle interazioni con la cellula ospite

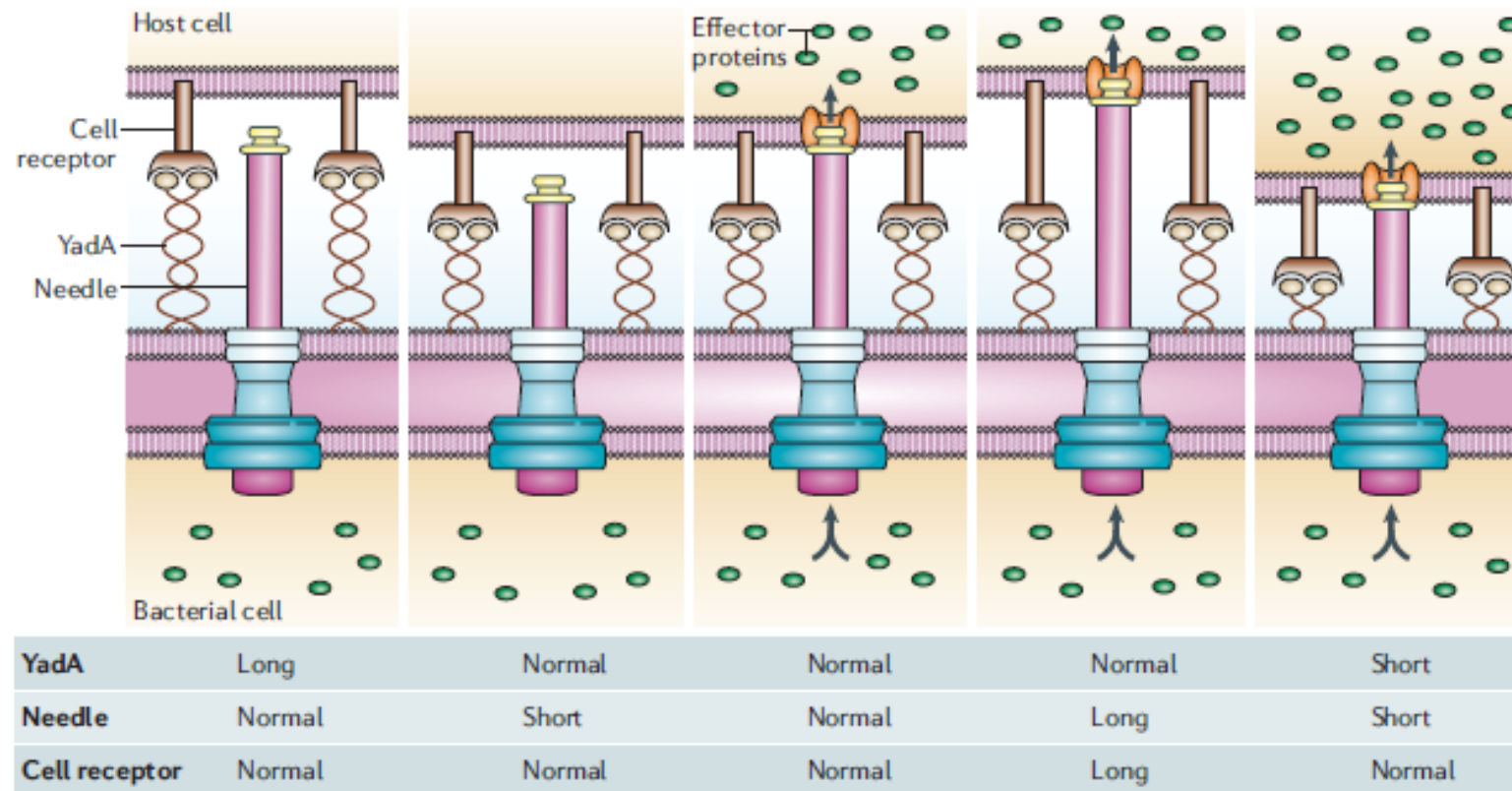


Figure 7 | The role of the needle structure. The docking of the bacterial cell to a target host cell occurs by contact between an adhesin (here YadA) and a receptor on the surface of the host cell (the identity of the receptor for YadA is currently unknown). Other structures are present at the bacterial surface, including lipopolysaccharide (not shown). The bacterial and target cell membranes are separated by a gap and the needle structure bridges this gap. This allows the bacterial effector proteins to be exported, in one step, from the bacterial cytosol to the cytosol of the target cell. In addition, the needle functions as a sensor. If the needle is too short, effector protein export is not triggered. In this experiment, the length of the needle and the adhesin from *Yersinia enterocolitica* E40 have been increased or decreased by genetic engineering, and the translocation of a reporter protein (based on the YopO kinase) was monitored¹⁰³.

Thus, increasing the distance between the needle tip and the host cell by shortening the needle or by lengthening YadA reduces translocation; i.e., the needle needs to have a minimal length to be fully functional

Ruolo degli effettori Yops: l'azione antifagocitica

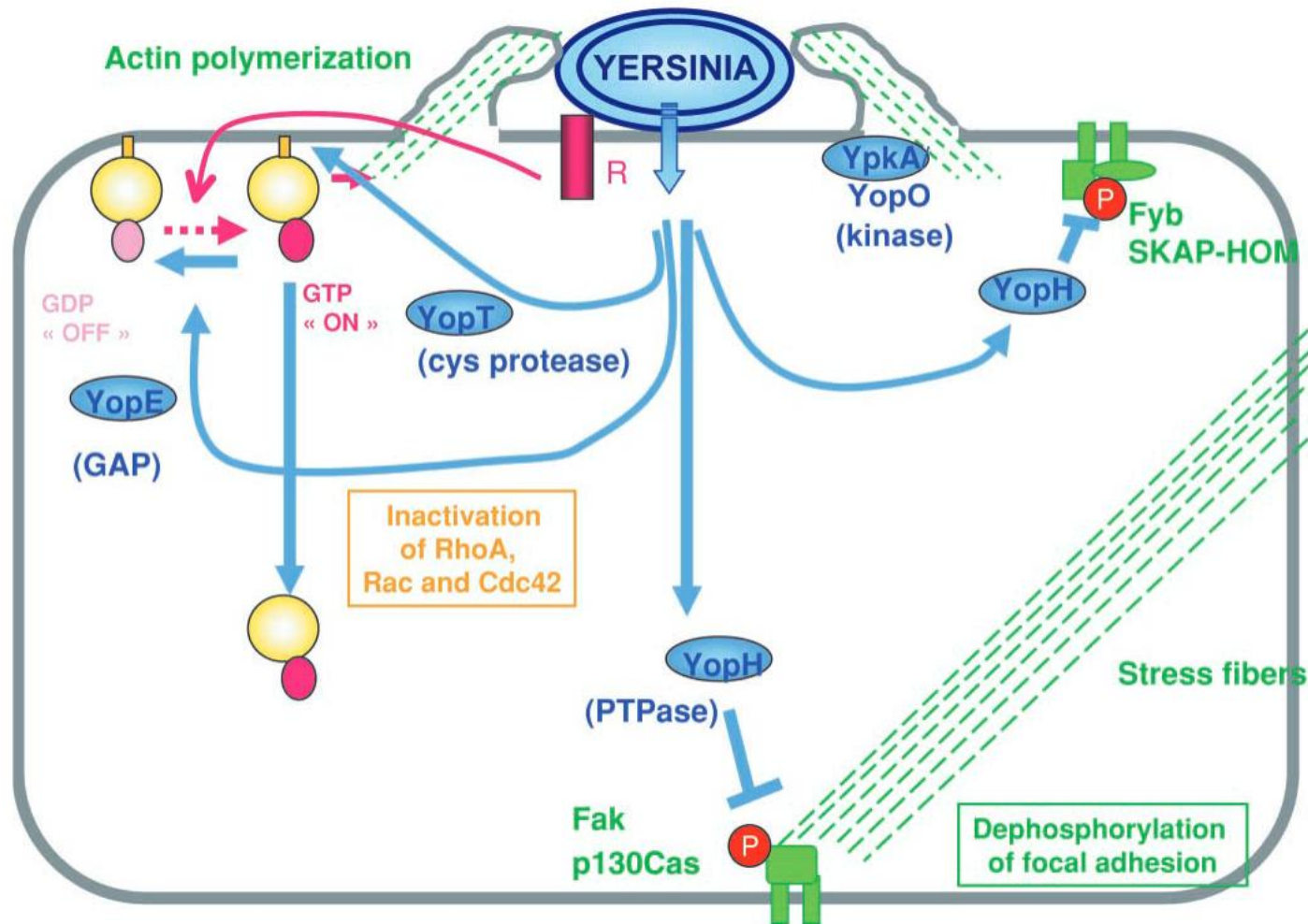


Figure 2. **Antiphagocytic action of the Yops.** Upon contact with a phagocyte receptor (R), a signaling cascade is triggered and GTP-bound Rho family members (RhoA, Rac-1, Cdc42) promote actin polymerization. YopE, acting as a GAP, down-regulates Rac-1, Cdc42, and RhoA. The YopT protease cleaves the COOH terminus of RhoA, Rac, and Cdc42, liberating them from the plasma membrane. The YpkA/YopO kinase becomes autophosphorylated upon contact with actin and interacts with RhoA and Rac-1. The PTPase YopH is targeted to focal adhesions and to other protein complexes where it dephosphorylates proteins such as the focal adhesion kinase (Fak), p130Cas, and SKAP-HOM.

In seguito al contatto con il recettore sui fagociti, viene iniziata una cascata di segnalazione e i membri della famiglia Rho (quali Rho, Rac-1, Cdc42) promuovono la polimerizzazione dell'actina

Quattro effettori (**YopH, YopE, YopT and YpkA/YopO**) sui sei principali hanno un effetto negativo sulla struttura del citoscheletro, contribuendo così alla resistenza di *Yersinia* alla fagocitosi da parte dei macrofagi e delle cellule polimorfonucleate (PMN).

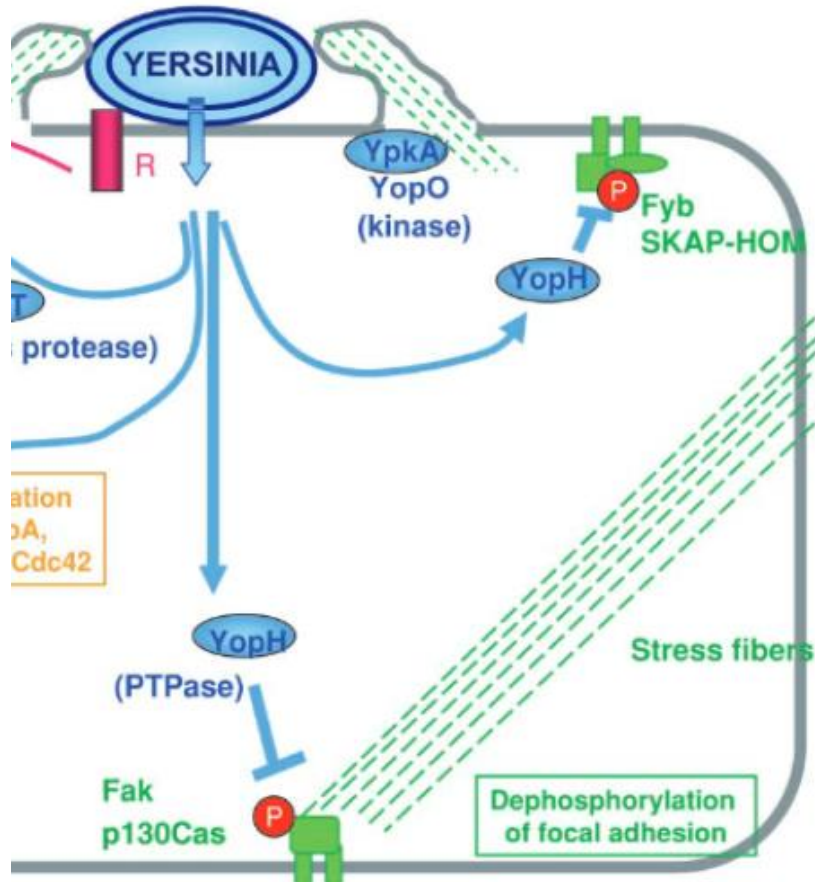
La perdita di uno di questi fattori diminuisce il potenziale antifagocitario di *Yersinia* indicando che tutti e 4 gli effettori concorrono ad impedire che *Yersinia* sia fagocitata dalle cellule del sistema immunitarie dell'ospite.

I fagociti sono in grado di circondare ed inglobare un batterio in un lasso di tempo brevissimo (meno di 1 minuto).

Uno dei ruoli principali delle proteine esportate dal T3SS (effettori) è quello di proteggere il batterio dalla fagocitosi.

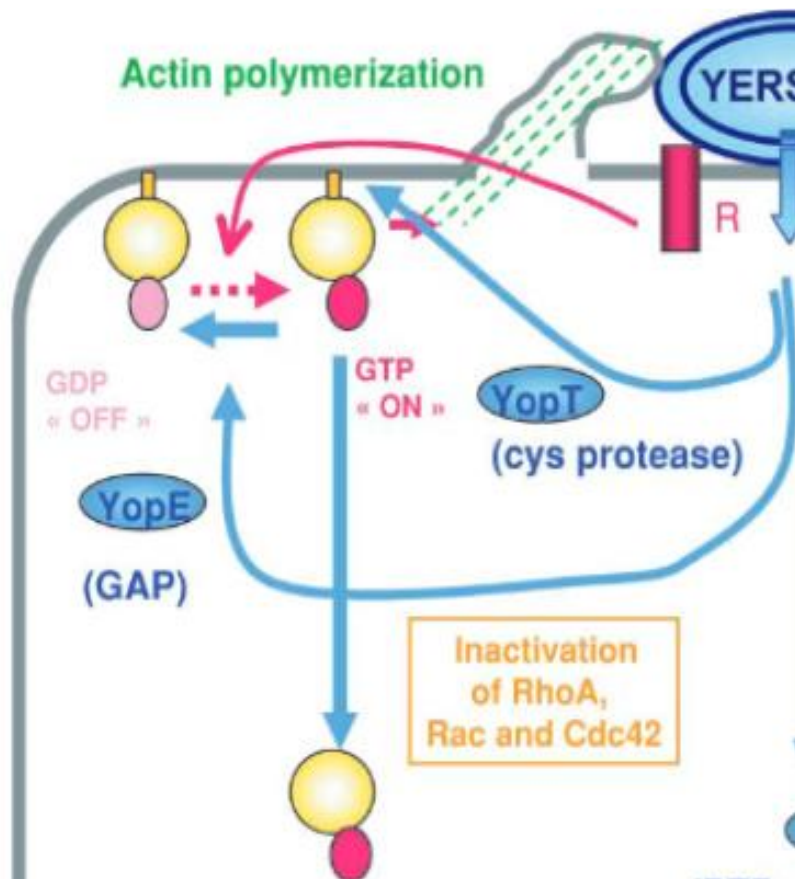
L'attivazione e il funzionamento del T3SS che è stato già preassemblato (ma non è ancora funzionale) è un processo rapido: entro 30 secondi dall'infezione *Yersinia* è in grado di provocare la defosforilazione di proteine chiave nei macrofagi (tramite YopH).

Ruolo degli effettori Yop: la fosfatasi YopH



- YopH è una delle più potenti fosfotirosin fosfatasi (PTPasi).
- E' in grado di defosforilare Fak e p130 cas (nei focal –adhesion complexes) e Fyb e SKAP-HOM in an adhesion-signalling complex.
- Mutazioni nei residui 223-226 impediscono a YopH di dirigersi verso le focal adhesions e bloccano l'attività antifagocitaria di *Yersinia* nei macrofagi.
- YopH interagisce anche con le proteina FyB e SKAP_HOME che normalmente interagiscono tra loro e vengono fosforilate in risposta all'adesione di microrganismi ai macrofagi. La loro desforilazione da parte di YopH fa sì che *Yersinia* interferisca con queste via di segnalazione.
- YopH inoltre sopprime oxidative burst nei macrofagi

Ruolo di YopE e YopT

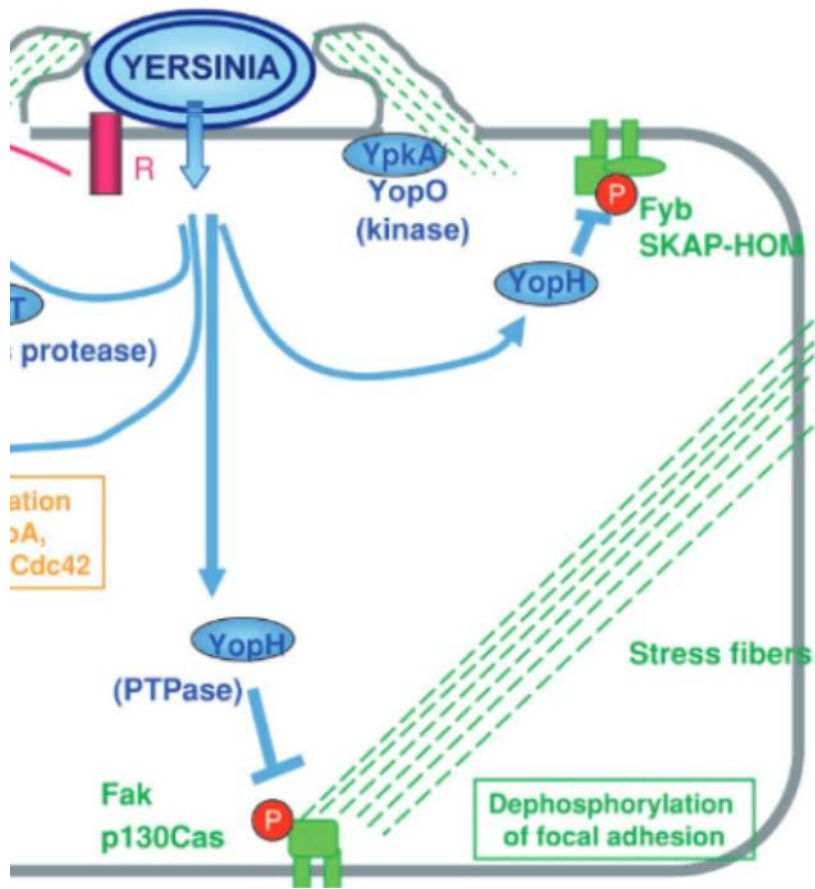


YopE

- YopE è uno degli effettori più abbondantemente traslocati nelle cellule ospiti ed è essenziale per la virulenza.
- E' altamente citotossico e induce alterazione della morfologia delle cellule. La forma arrotondata che assumono è dovuta alla distruzione del citoscheletro ed in particolare dei microfilamenti.
- YopE agisce come GAP (GTPasi Activating Protein) sulle GTPasi della famiglia Rho. Queste GTPasi fanno parte di una grande famiglia che oscilla tra la forma ON ed OFF in accordo con il nucleotide che legano GTP (ON) – GDP (OFF). YopE agisce come GAP facendo assumere a queste proteine la forma OFF, accelerando l'idrolisi di GTP. In vivo agisce prevalentemente su Rac mentre in vitro agisce sia Rho, Rac e Cdc42.
- L'attività GAP fa sì che YopE abbia una funzione antifagocitica.

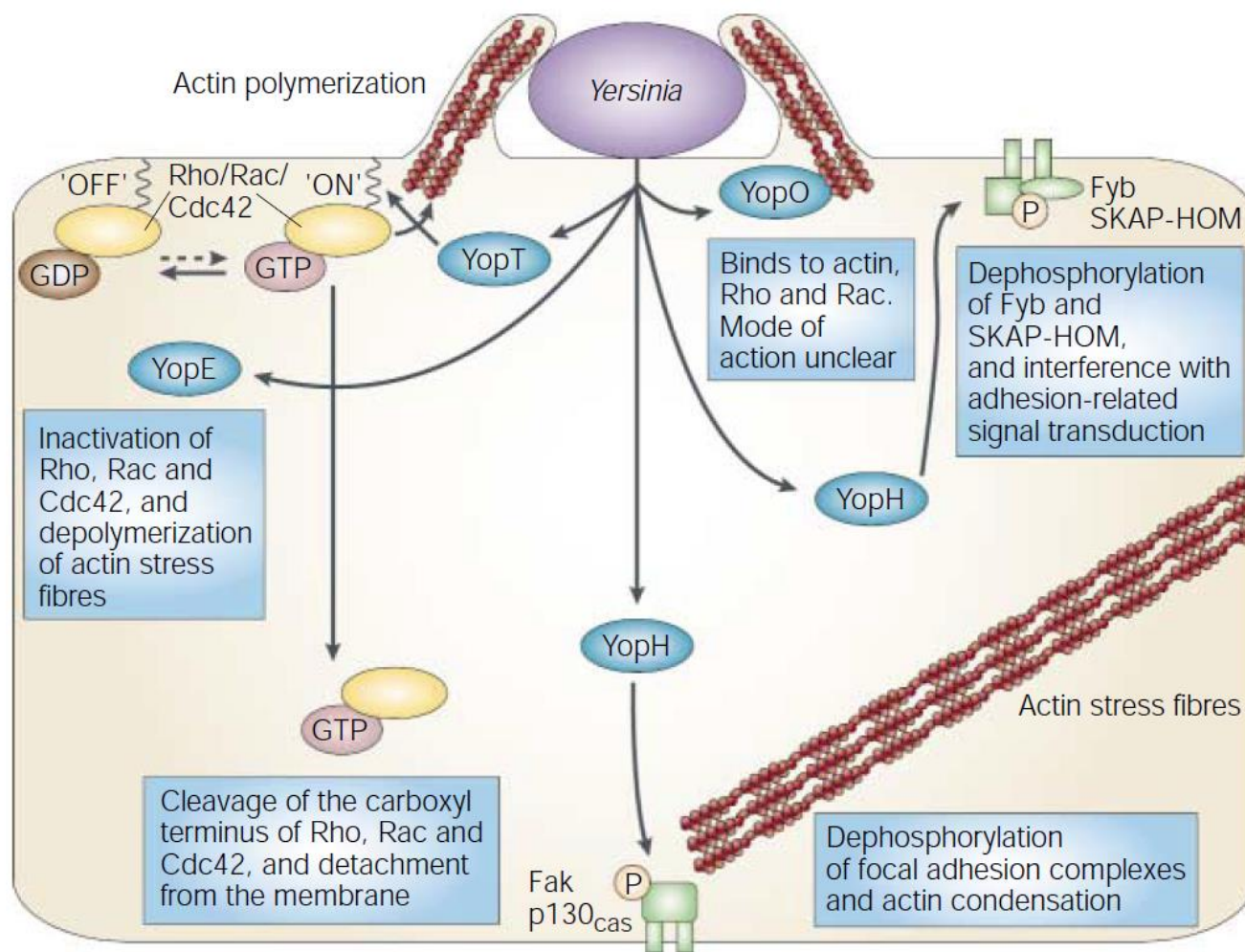
YopT

- YopT ha un forte effetto depolimerizzante sull'actina in quanto modifica le proteine della famiglia Rho spostandole dalla membrana al citoplasma.
- YopT è una cystein proteasi che taglia RhoA, Rac and CdC42 vicino alla sequenza C-terminale che le teneva legate alla membrana facendole così rilasciare dalla membrana. In questo caso l'inattivazione non è dovuta al blocco dell'alternarsi del legame tra GDP e GTP ma al rilascio delle proteine dalla membrana.



Ruolo di YpkA (YopO)

- YpkA -Yersinia protein kinasi (chiamata anche YopO)- modula anche'essa le dinamiche del citoscheletro. E' una serin-treonin kinasi in grado di autofosforilarsi.
- Diventa attiva dopo aver interagito con l'actina o con altri fattori presenti in estratti cellulari .
- YpkA non solo è attivata dall'actina ma l'actina è anche il suo substrato.
- E' inoltre in grado di legare le proteine della famiglia Rho (sia nella forma GDP-GTP)

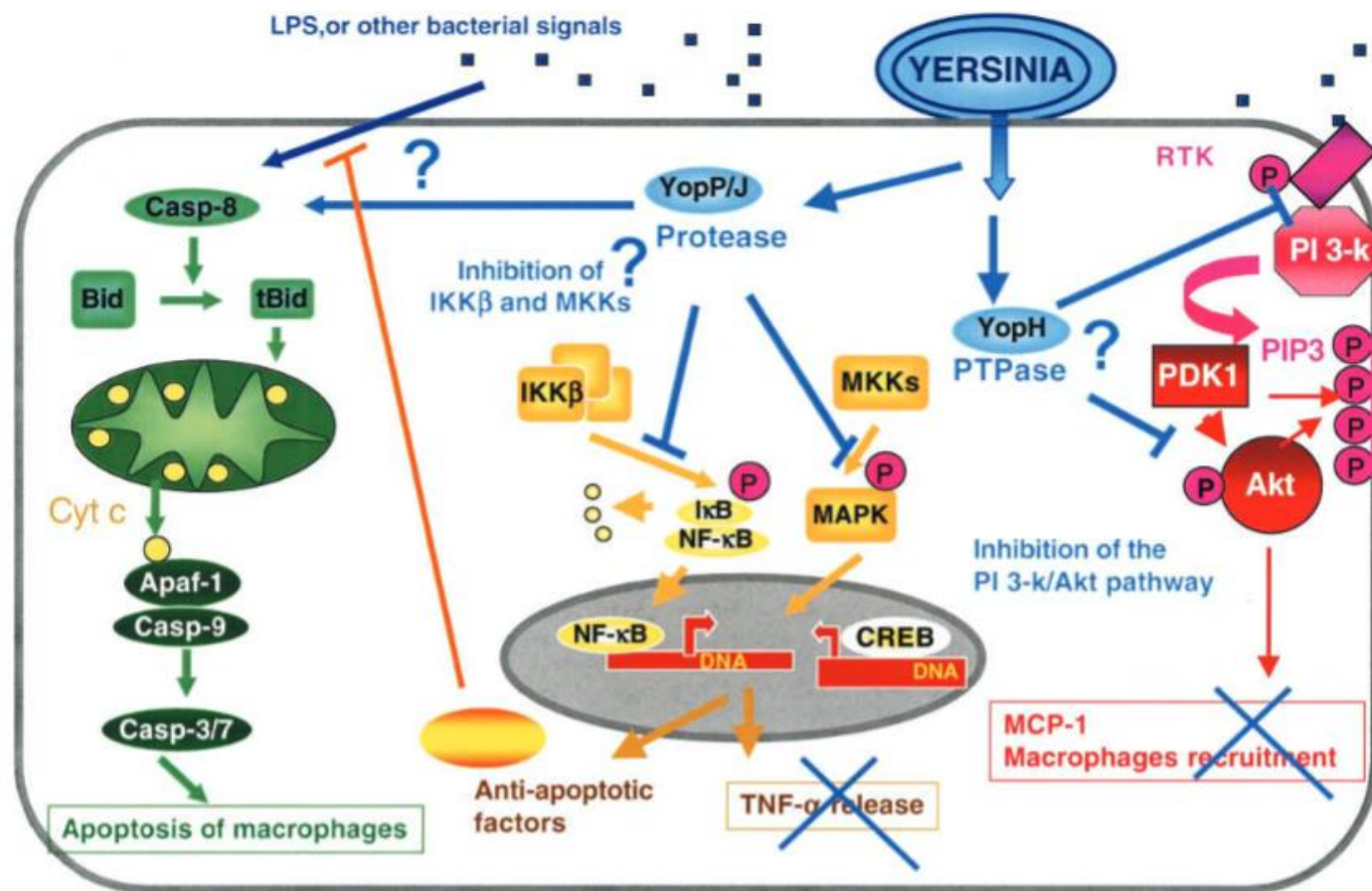


I target cellulari degli effettori Yops.

Figure 2 | **Targets of YopE, YopH, YopT and YpkA/YopO.** YopH is a powerful protein tyrosine phosphatase that dephosphorylates Fak and p130_{cas} in focal adhesion complexes, as well as Fyb and SKAP-HOM in an adhesion-signalling complex. YopE exerts a GTPase-activating protein (GAP) activity on monomeric GTPases from the Rho family (Rho, Rac and Cdc42), and YopT cleaves the same monomeric GTPases close to their carboxyl terminus, which releases them from their membrane anchor. The actions of YopE and YopT both result in the inactivation of Rho proteins and the depolymerization of actin stress fibres. YopO is a kinase with homology to eukaryotic serine/threonine kinases that is activated by actin binding and binds RhoA and Rac1. Its mode of action is unclear at present.

Effettori e risposta immunitaria : il ruolo di YopP/J e YopH

2 effettori intracellulari YopP/J e YopH sono in grado di contrastare l'insorgere della risposta proinfiammatoria delle cellule infettate

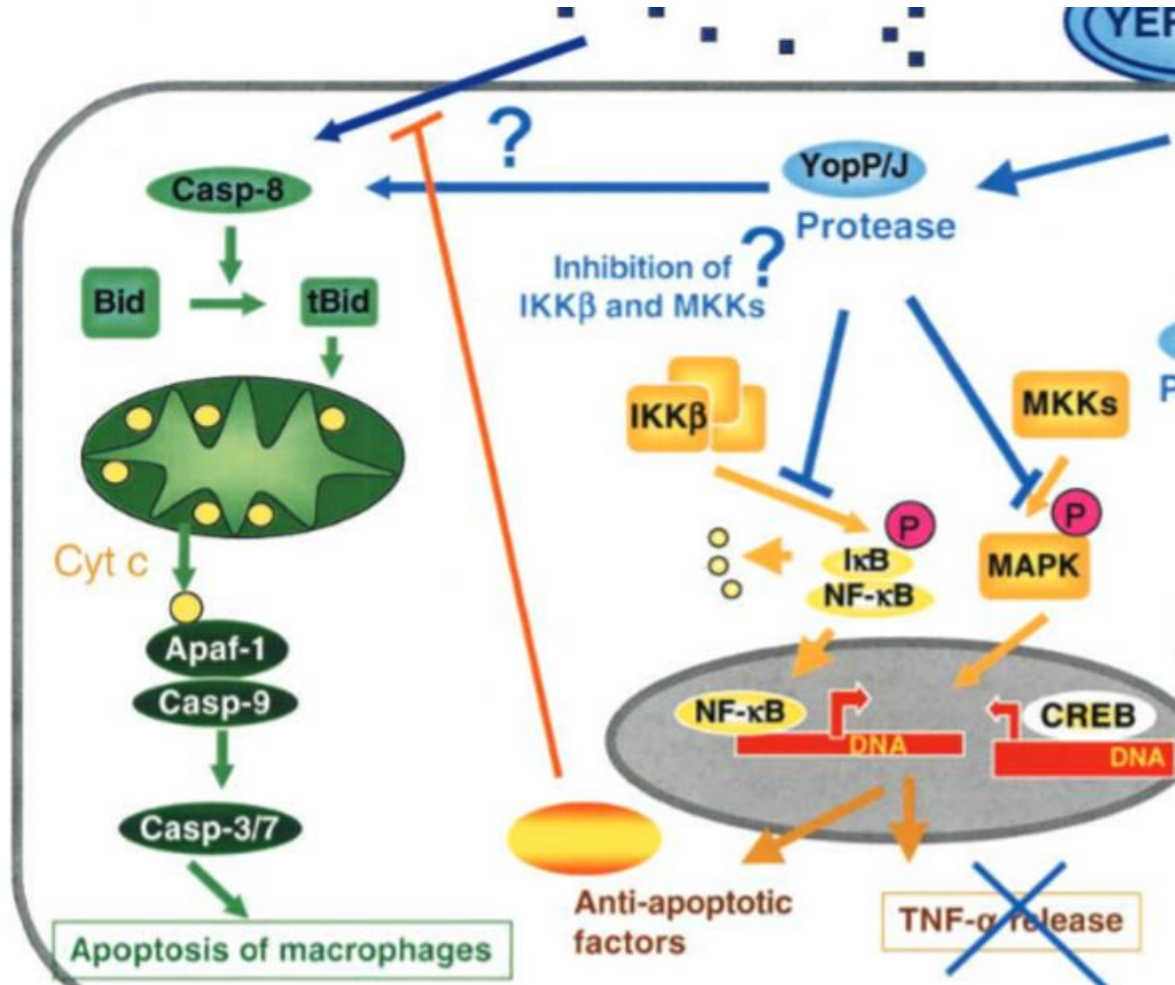


YopH è in grado di defosforilare fattori essenziali della via fosfatidilinositol-3 kinasi /Akt

YopH inibisce la produzione della proteina MCP1 (una proteina chemioattraente per i monociti) grazie al suo ruolo di defosfatasi.

Figure 3. **Down-regulation of the inflammatory response.** YopP binds and blocks the IκB kinase β (IKKβ), which inhibits the phosphorylation and degradation of IκB, the inhibitor of NF-κB. This in turn prevents the migration of the transcription factor NF-κB to the nucleus. The absence of NF-κB in the nucleus prevents transcription of antiapoptotic genes and several proinflammatory genes including the TNF-α gene. YopP also blocks the MKKs, inhibiting the activation of MAPK, which abrogates activation of CREB, another transcription factor involved in the immune response. YopP induces apoptosis in macrophages, either directly by acting upstream of Bid or indirectly by blocking the synthesis of NF-κB-dependent antiapoptotic factors. Yop H inhibits the production of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) by dephosphorylating key players in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway.

Blocco della risposta pro-infiammatoria: ruolo di YopP/J



In assenza di YopP/J LD_{50} è oltre 60 volte più elevata che nel wt.

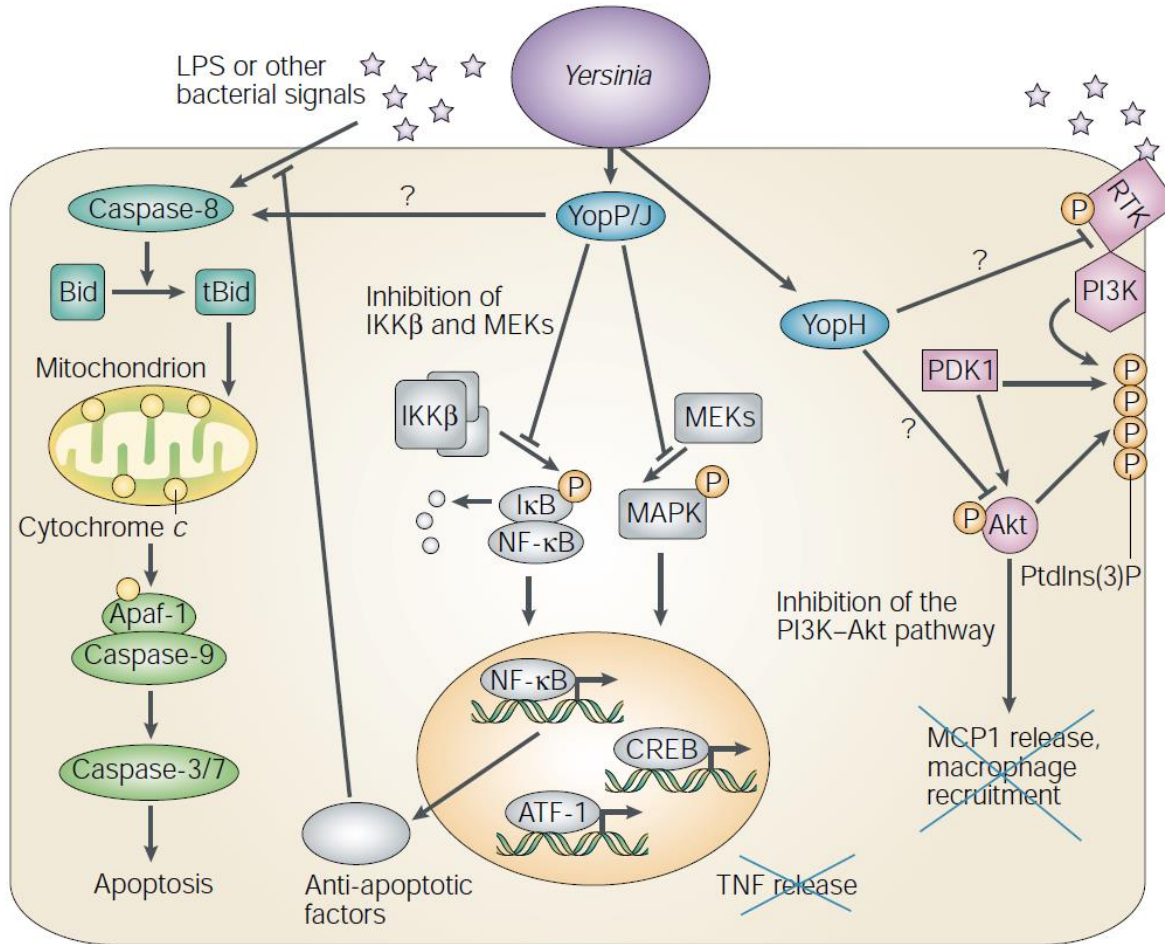
YopP/J

- riduce la presentazione delle molecole di adesione come ICAM (intercellular adhesion molecule1) e la E-selectin riducendo così il reclutamento di PMN nel sito di infezione.
- riduce il rilascio di TNF (tumor necrosis factor) nei macrofagi e di IL-8 (Interleukina 8) nelle cellule epiteliali ed endoteliali.

Tutti questi effetti sono dovuti ad una diminuzione nel livello di NF-κB, il fattore di trascrizione che svolge un ruolo cruciale.

- YopP/YopJ blocca la fosforilazione di IκB prevenendone la degradazione e in questo modo previene la migrazione traslocazione di NFκB al nucleo.
- YopP/J blocca inoltre la fosforilazione delle MAPK chinasi con la conseguente blocco della trascrizione di geni regolati da CREB coinvolti nella sintesi di fattori di adesione e molecole proinfiammatorie

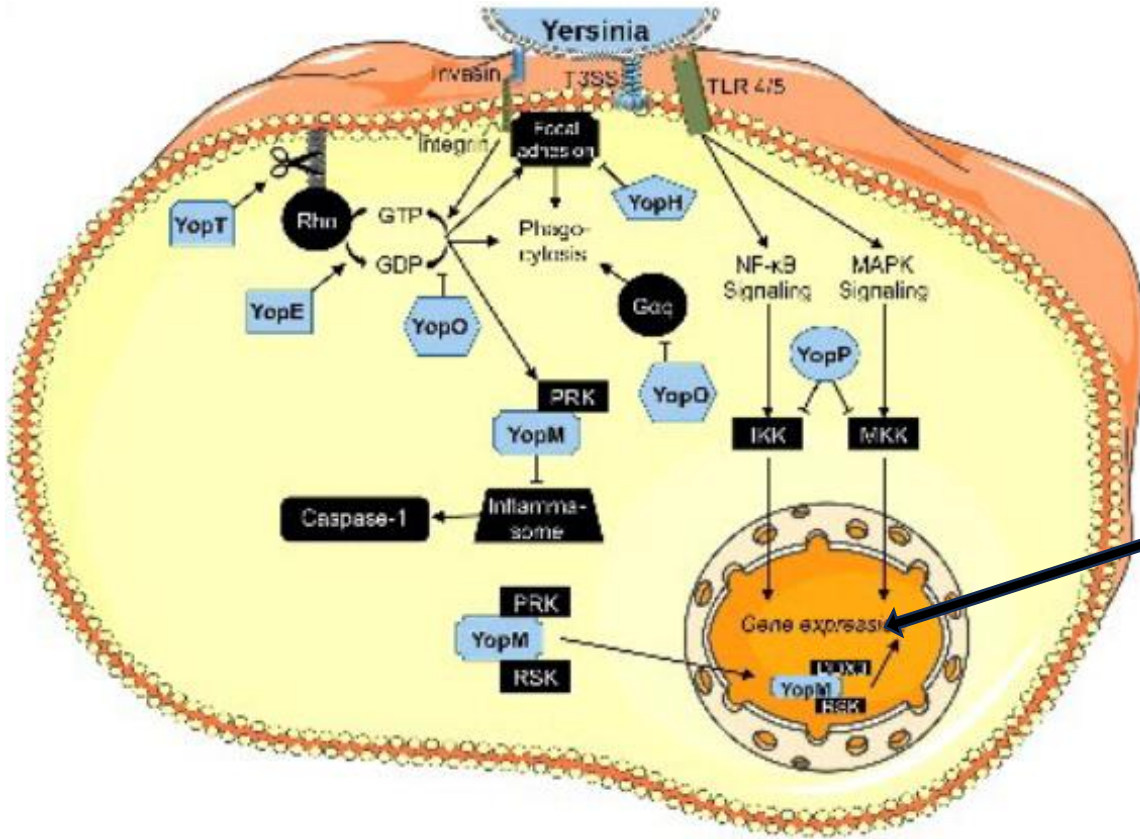
YopP/J e l'apoptosi nei macrofagi



YopP/J induce l'apoptosi nei macrofagi. Si osserva la classica cascata di eventi che porta all'apoptosi in risposta a segnali esterni.

- taglio proteolitico della proteina Bid tBid
- stimolazione del rilascio di citocromo C dai mitocondri
- conseguente taglio della caspasi-9,-3 e -7 che provocano la morte cellulare.

YopM: un effettore nel nucleo



- YopM è un importante fattore di virulenza e in mancanza di YopM i ceppi sono attenuati.
- YopM è una proteina acida che contiene 13-20 ripetizioni di un motivo di 19 residui ricco in leucina. 4 monomeri di YopM possono formare un cilindro cavo.
- **YopM viene traslocato nelle cellule bersaglio dove migra nel nucleo.**
- La presenza di YopM nel nucleo provoca la repressione di molti geni coinvolti nel ciclo cellulare e nella crescita cellulare.

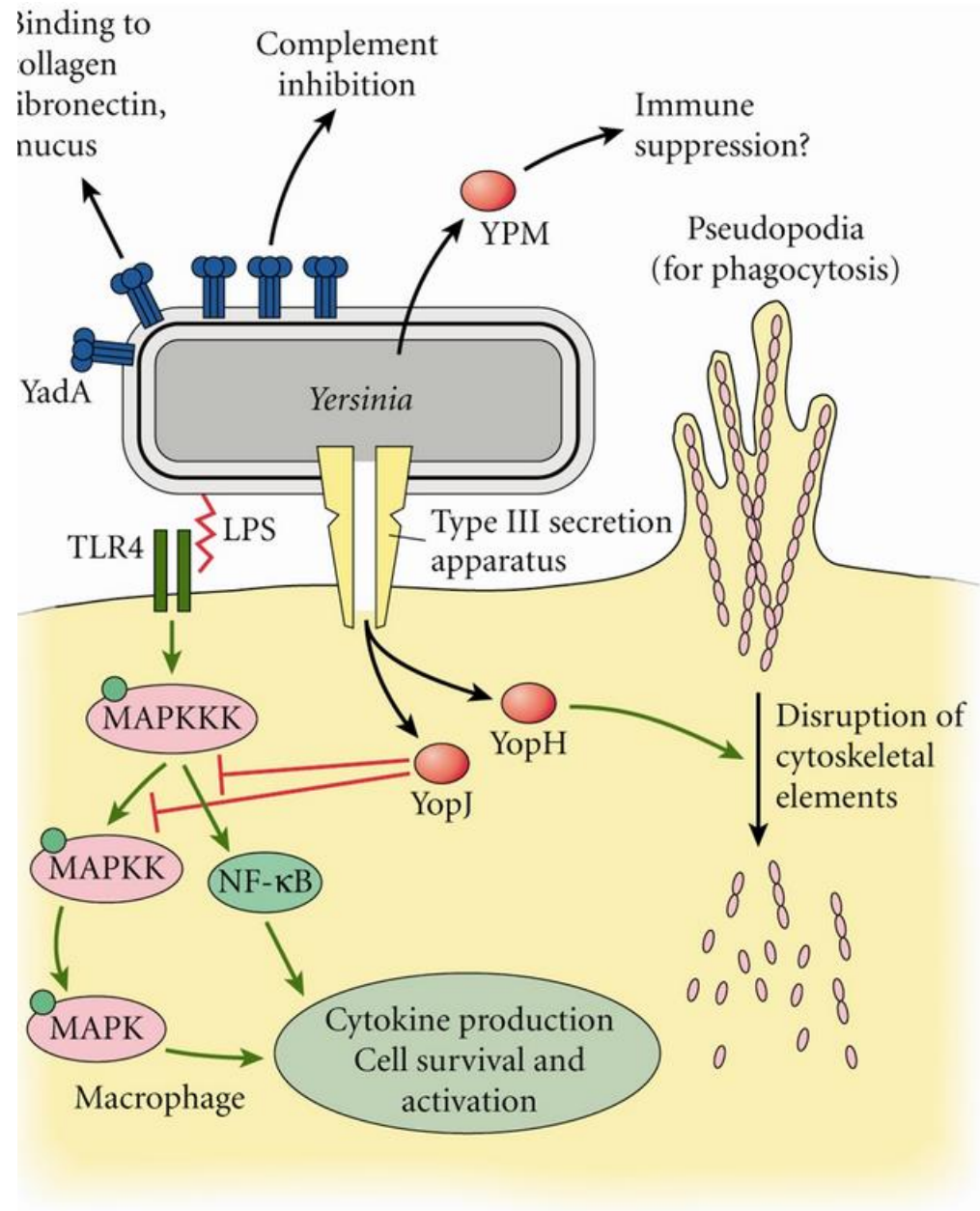
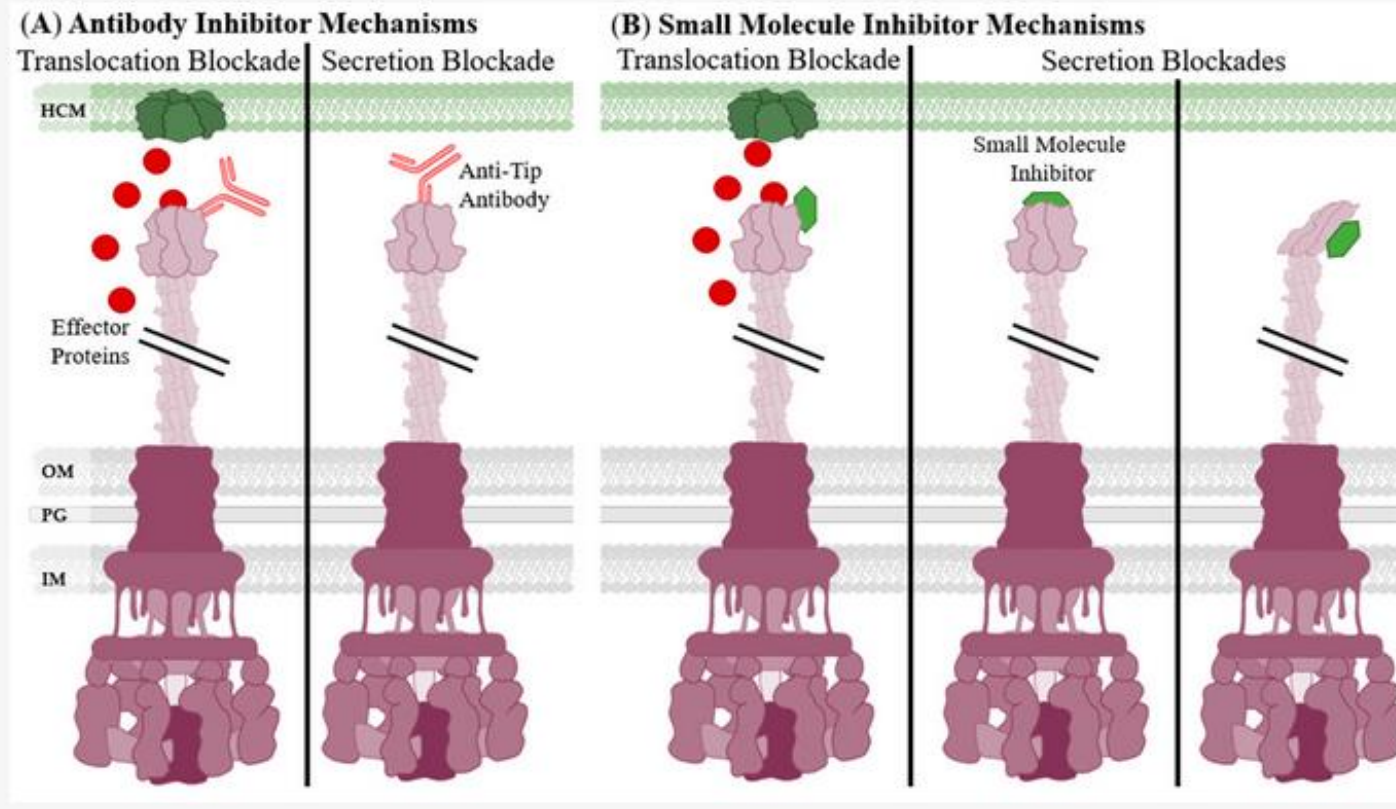
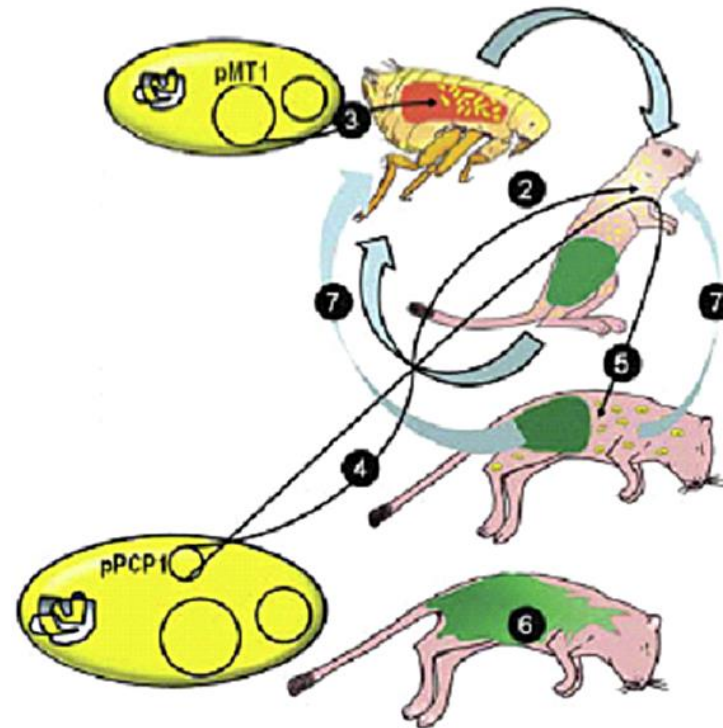
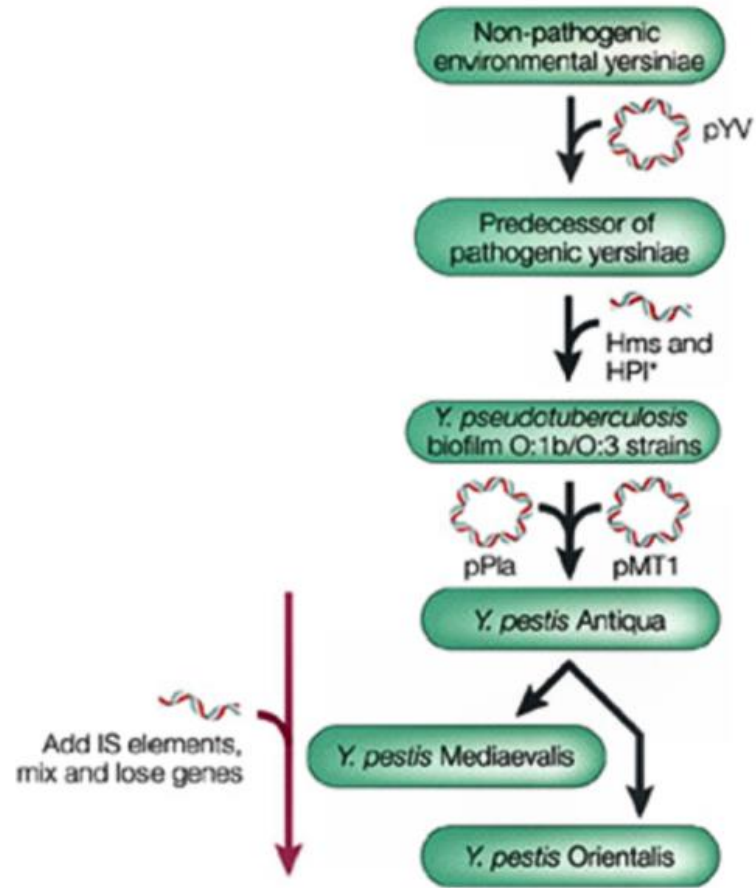


Figure 5. Inhibitors interacting with the T3SS needle tip. **(A)** Antibody inhibitors; **Left:** Antibody binding to the needle tip preventing binding to the translocon; **Right:** Antibody binding and physically preventing the secretion of effectors; **(B)** Small molecule inhibitors; **Left:** Translocation blockade caused by the inhibitor binding to the needle tip; **Middle:** Small molecule binding and physically preventing effector secretion; **Right:** Conformational change of needle tip protein caused by small-molecule binding. Image modified from [102]. Abbreviations: OM, outer membrane; PG, peptidoglycan; IM, inner membrane; HCM, host cell membrane.

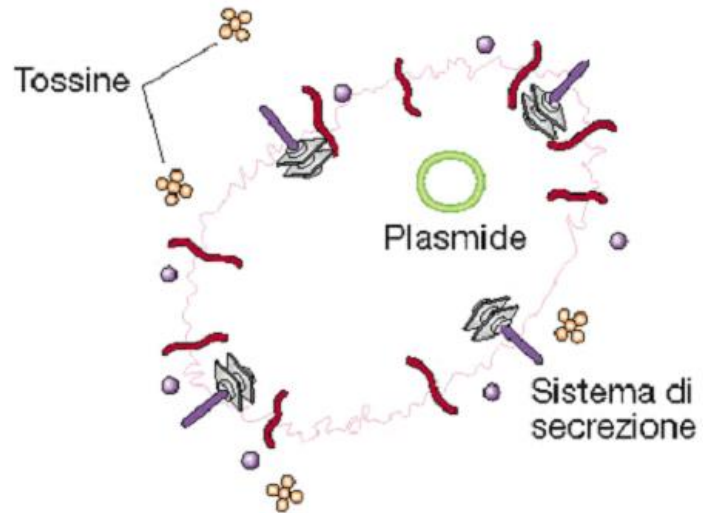


La ricerca di inibitori del T3SS: una nuova strategia.

Un'evoluzione complessa, rapida ed inesorabile



L'evoluzione di *Yersinia pestis*, un paradigma del ruolo dei plasmidi



I plasmidi possono contenere geni per i sistemi di secrezione, per adesine, per tossine e in un sol colpo permettono al batterio di colonizzare una nuova nicchia.

Evoluzione di Y. pestis da Y.pseudotuberculosis

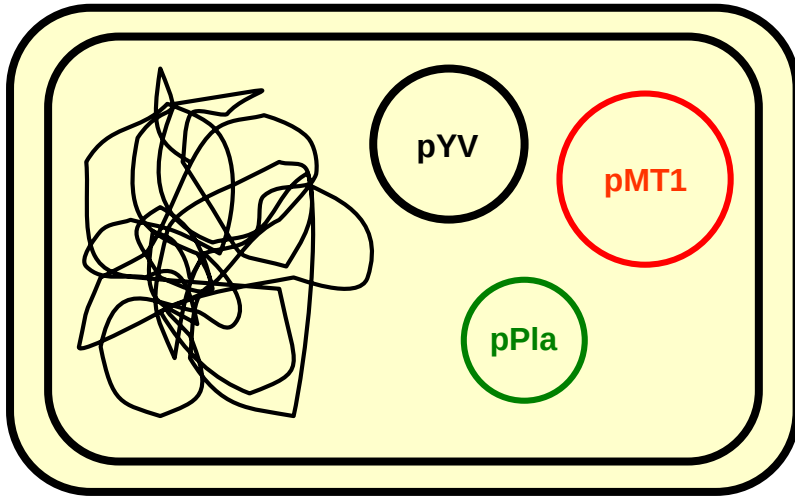
Il primo passo della transizione da *Y. pseudotuberculosis* a *Y. pestis* è stato l'acquisizione del gene *ymt*, presente sul plasmide *pMT1*

La trasformazione di *Y. pseudotuberculosis* con il gene *ymt* è sufficiente ad estendere l'infezione nella pulce

Per la trasmissione dal vettore insetto all'ospite mammifero è necessaria la formazione del biofilm nel proventriculus

I geni *hms* (*hmsHFRS*, *hmsT* e *hmsP*) sintetizzano una matrice extracellulare fondamentale per la formazione del biofilm

I geni *hms*, presenti sul cromosoma, sono funzionali sia in *Y. pseudotuberculosis* sia in *Y. pestis* ma hanno una diversa regolazione



Plasmide pMT1

contiene le informazioni necessarie per proteggere il batterio dall' azione batteriolitica di enzimi presenti nel tratto gastrointestinale della pulce.

Plasmide pPla

contiene le informazioni necessarie per l'attivazione del plasminogeno dell'ospite che degraderà

- alcuni fattori del complemento impedendo la chemiotassi dei fagociti
- la fibrina permettendo la disseminazione del batterio nell'ospite

Il plasmide *pMT1*

È un grande plasmide di circa 100 kb. Codifica per

- la **Yersinia Murine Toxin (Ymt)** , una fosfolipasi D (PLD) che aumenta le probabilità di sopravvivenza del batterio nell'intestino dell'insetto. Il gene *ymt* viene espresso a 26°C
- la capsula F1: importante per la resistenza alla fagocitosi; il gene *caf1* codifica per la proteina F1 (15.5 kDa), che forma una capsula esterna che riveste il batterio, e i geni *caf1M*, *caf1A* e *caf1R* codificano per regolatori e chaperonine.

I geni della capsula F1 hanno un contenuto in G+C del 39.2%, il locus *ymt* 38.2% e il resto del plasmide 50.1%; ciò suggerisce che il plasmide *pMT1* sia un mosaico genetico.

Il plasmide *pPla*

È un piccolo plasmide di 9.6 kb che codifica per:

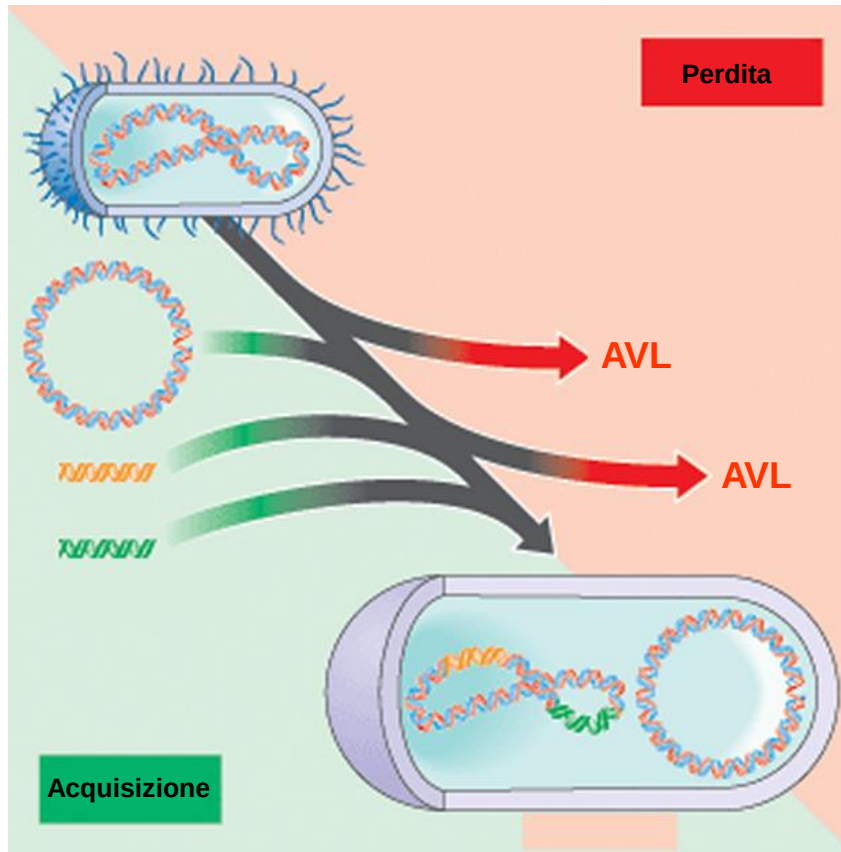
- L'attivatore del plasminogeno (Pla): è una proteasi di 34.6 kDa che taglia il plasminogeno, precursore della plasmina, ed è fondamentale per l'infezione nell'ospite mammifero
- Si è recentemente osservato che Pla è associato con infezione polmonare fulminante.
- La pesticina (Pst) è una tossina ed ha un'azione battericida. È simile al lisozima ed è in grado di degradare il peptidoglicano.

Oltre al pYV, tutti i ceppi di *Yersinia* patogeni hanno acquisito il locus ail che svolge un ruolo nell'attachment e invasione delle cellule epiteliali e nella resistenza al killing da parte dei macrofagi.

Altri elementi specifici (*Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis*) che sono stati acquisiti includono l'isola di alta patogenicità (HP1) che è un ICE (Integrative Conjugative Element) che codifica yersiniabactina, un sideroforo che sequestra il Fe dall'ospite e importa lo zinco nelle cellule batteriche

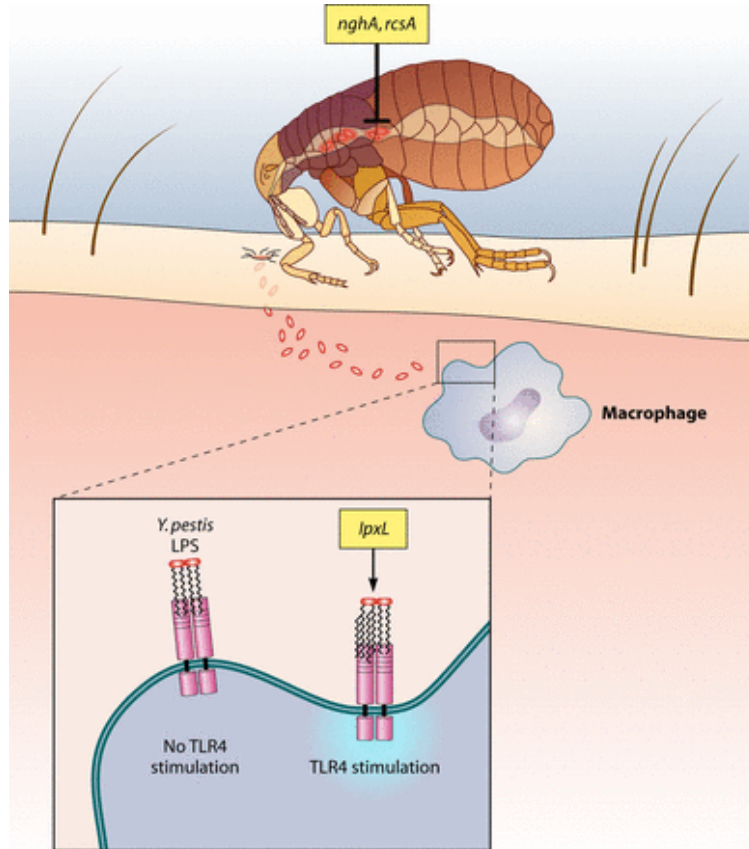
Gli altri geni essenziali nell'evoluzione di *Y. pestis* sono il locus *hms* localizzato sul cromosoma che codifica un sistema di stoccaggio dell'emina. Questo locus è un fattore importante ed è richiesto nella formazione dei biofilm che bloccano l'intestino della pulce con un riflusso di sangue dalla pulce infetta al punto di infezione facilitando la diffusione della malattia al mammifero ospite

Le mutazioni pato_(genicità)-adattative



- Sono mutazioni in geni cromosomici funzionali nel batterio progenitore
- Aumentano il "benessere" del batterio nel nuovo ambiente all'interno dell'ospite
- Permettono al microrganismo di ottimizzare il nuovo stile di vita patogeno
- I geni che vengono persi sono definiti "geni di antivirulenza" (AVL); codificano funzioni diverse a seconda dei microrganismi

Il vantaggio selettivo di perdere funzioni



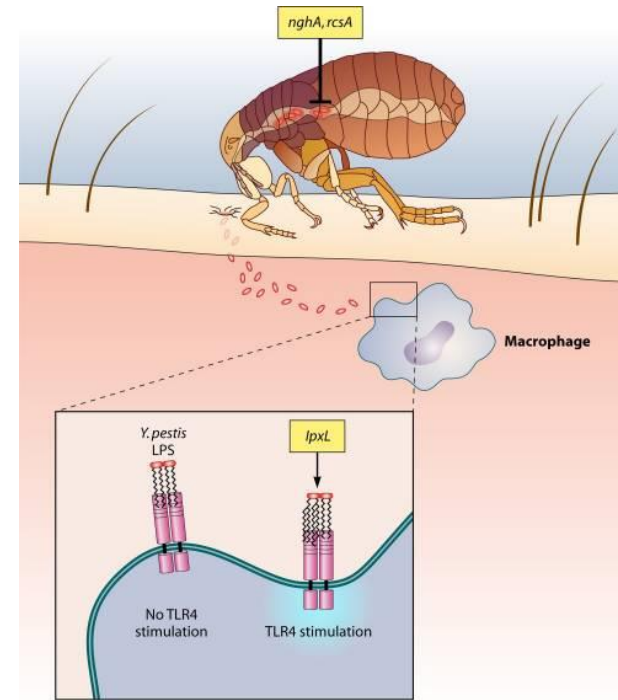
Rispetto al suo progenitore, *Y. pseudotuberculosis*, in *Y. pestis* si osserva la perdita di funzionalità del 13% dei geni. Sono eliminati:

1. i geni che impediscono un'efficiente formazione dei biofilm nella pulce
2. i geni che modificano la parete del batterio per renderla irriconoscibile ai recettori del sistema dell'immunità innata dell'ospite

Perdita di geni

Y. pestis si è evoluto circa 1.500-20.000 anni fa dal suo antenato *Y. pseudotuberculosis*, passando da un ciclo vitale a trasmissione oro-fecale dall'ambiente all'ospite ad un ciclo vitale di tipo vettore-ospite-vettore.

La perdita di geni è un passo importante nel processo di adattamento.



Gene	Ruolo	Localizzazione	Presente in:	
			<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
<i>rcsA</i>	Regolatore trascrizionale	Cromosoma	pseudogene	+
<i>nghA</i>	Degradazione biofilm	Cromosoma	pseudogene	+
<i>lpxL</i>	Modifica il lipide A	Cromosoma	-	+
<i>yadA</i>	Adesione cellulare	<i>pYV</i>	pseudogene	+
<i>ureD</i>	Sintesi di ureasi	Cromosoma	pseudogene	+

Il 13% dei geni di *Y. pseudotuberculosis* non sono funzionali in *Y. pestis*

Le mutazioni patoadattative : la perdita di RcsA

RcsA è un regolatore negativo per la sintesi dei biofilm. RcsA è una proteina accessoria del sistema delle istidin chinasi Rcs che è in grado di aumentare l'effetto repressivo di RcsB, una DNA binding protein coinvolta nella regolazione negativa della formazione di biofilm.

La perdita di RcsA diminuisce la stabilità di legame e di conseguenza l'attività di repressore di RcsB che a questo punto è incapace di reprimere i geni coinvolti nella biosintesi del biofilm

Introduzione del gene *rcsA* wt di *Y.pseudotuberculosis* provoca in *Y.pestis*:

- *Inibizione della formazione di biofilm*
- *diminuisce il blocco dell'apparato intestinale*

Quando viene silenziato in *Y.pseudotuberculosis* il gene *rcsA* si osserva la formazione di biofilm in *C.elegans* (modello di infezione)

La mutazione più frequentemente osservata è una duplicazione di 30 bp nella sequenza codificante. Questa mutazione si ritrova in tutti le sottospecie di *Y. pestis* suggerendo che possa essersi originata molto presto per promuovere una cospicua produzione di biofilm ,fase essenziale per la trasmissione dalla pulce all'ospite. In *Y. pestis* Antiqua si osserva un inserzione di un trasposone per l'inattivazione del gene.

Mutazioni patoadattative : la perdita di *nghA*

Oltre a mutazioni che favoriscono la formazione di biofilm , durante l'evoluzione si sono messi a punto sistemi per evitare la degradazione del biofilm.

In *Y.pestis* la formazione della matrice extracellulare del biofilm nello stomaco della pulce dipende dall'espressione dei geni *hms* che permettono la sintesi di un biofilm ricco in una poly-glucosamina.

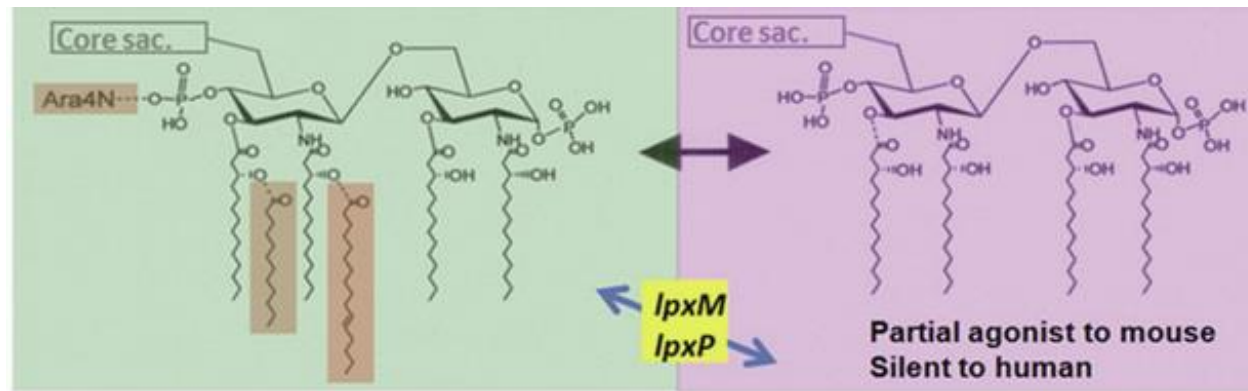
Il gene *nghA* codifica per una glicosil idrolasi e si è visto che questo gene in *Y. pestis* è sempre silenziato mentre è attivo in *Y. pseudotuberculosis*. La mutazione è dovuta ad una delezione di 11 bp che determina l'insorgenza di un codone stop con conseguente formazione di una proteina tronca e inattiva.

Quando il gene *nghA* di *Y.pseudotuberculosis* viene introdotto in *Y.pestis* si osserva

-La degradazione dei biofilm per digestione dei residui di N acetil glucosamina. Il ceppo riesce a colonizzare lo stomaco della pulce ma la formazione di biofilm è fortemente diminuita

La perdita di lpxL

La modificazione dell LPS.



Un'altra importante mutazione patoadattativa riguarda i gene lpx che sono in grado di modificare LPS, in particolare si osserva la perdita della capacità di convertire il lipide A dell LPS dalla forma tetra-acetilata in esa-acetilata.

Esa acetilazione è una modificazione post traduzionale del LPS che è cruciale nel provocare la risposta immune tramite l'interazione con il TLR4 sulla superficie della cellula.

Presentandosi in una forma non esacetilata *Y.pestis* induce solo una blanda risposta immune permettendo così al batterio di sopravvivere più facilmente nell'ospite.

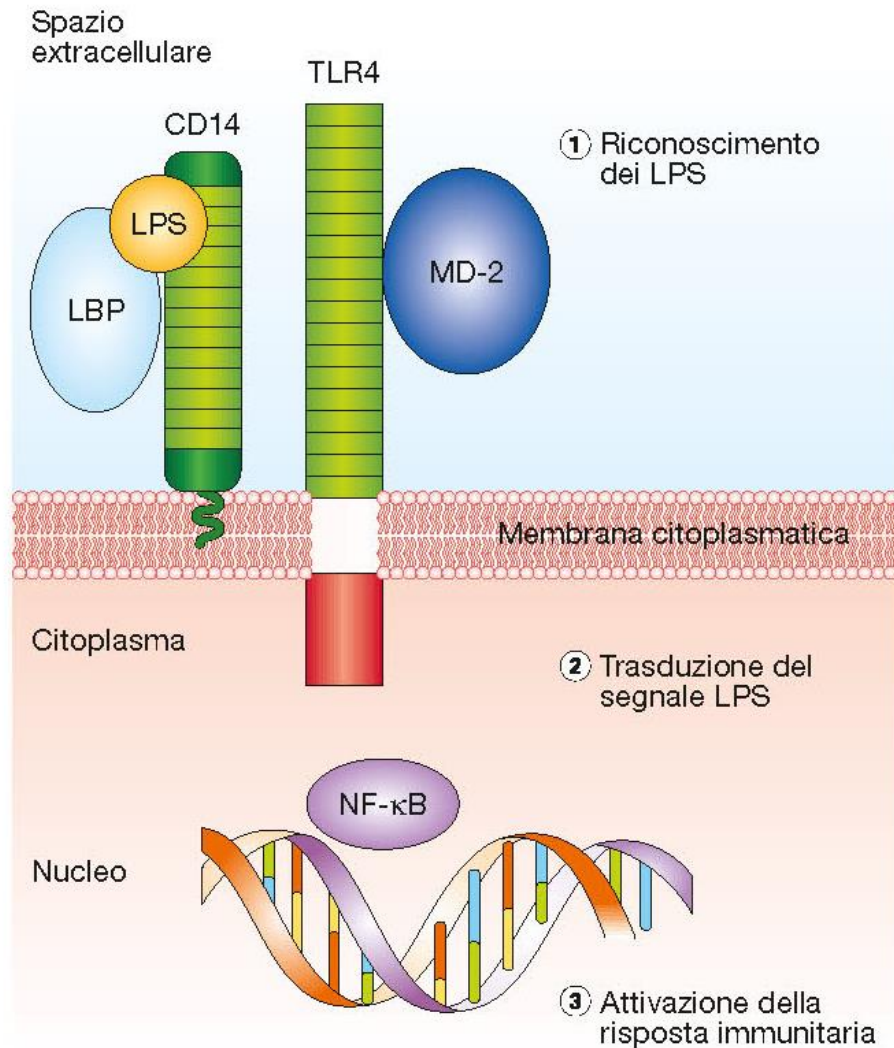
Y.pseudotuberculosis invece possiede la capacità di esaacetilare Lipide A dell'LPS e induce una buona risposta immune.

Esa acetilazione è determinata da 2 proteine: LpxL e LpxP.

LpxL che è Lauril acetiltransferasi è in grado di attaccare delle catene lipidiche secondarie all'unità tetracetilata di lipide A.

Questo gene è assente in tutti i ceppi di *Y.pestis*.

Come avviene il riconoscimento dell 'LPS da parte dei macrofagi?

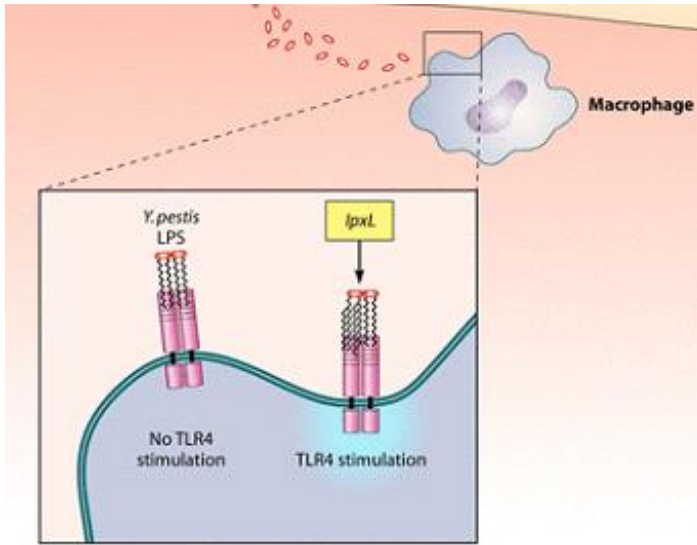


I toll like receptor (TLR) sono espressi principalmente nelle cellule immunocompetenti (macrofagi, cellule dendridiche)

Il legame dell'LPS all' TLR4 provoca l'attivazione di una via di segnalazione che attiverà la trascrizione del fattore NF κ B .e si avrà attivazione della risposta immunitaria.

Il processo richiede oltre al TLR4 altri fattori

- LBP proteina legante LPS presente nel siero.
 - le molecole CD14 che si ritrovano sia in forma solubile che associate alla membrana (CD14s e CD14m)
- La molecola MD2 che si associa al TLR.



Quando il gene *lpxL* di *E. coli* viene espresso in *Y. pestis* si osserva attivazione della risposta immune con un aumento di sintesi di TNF, IL-6 e IL-8 da parte delle cellule.

In un modello murino , il ceppo wt provoca 100% di mortalità mentre il ceppo complementato con *lpxL* non è letale.

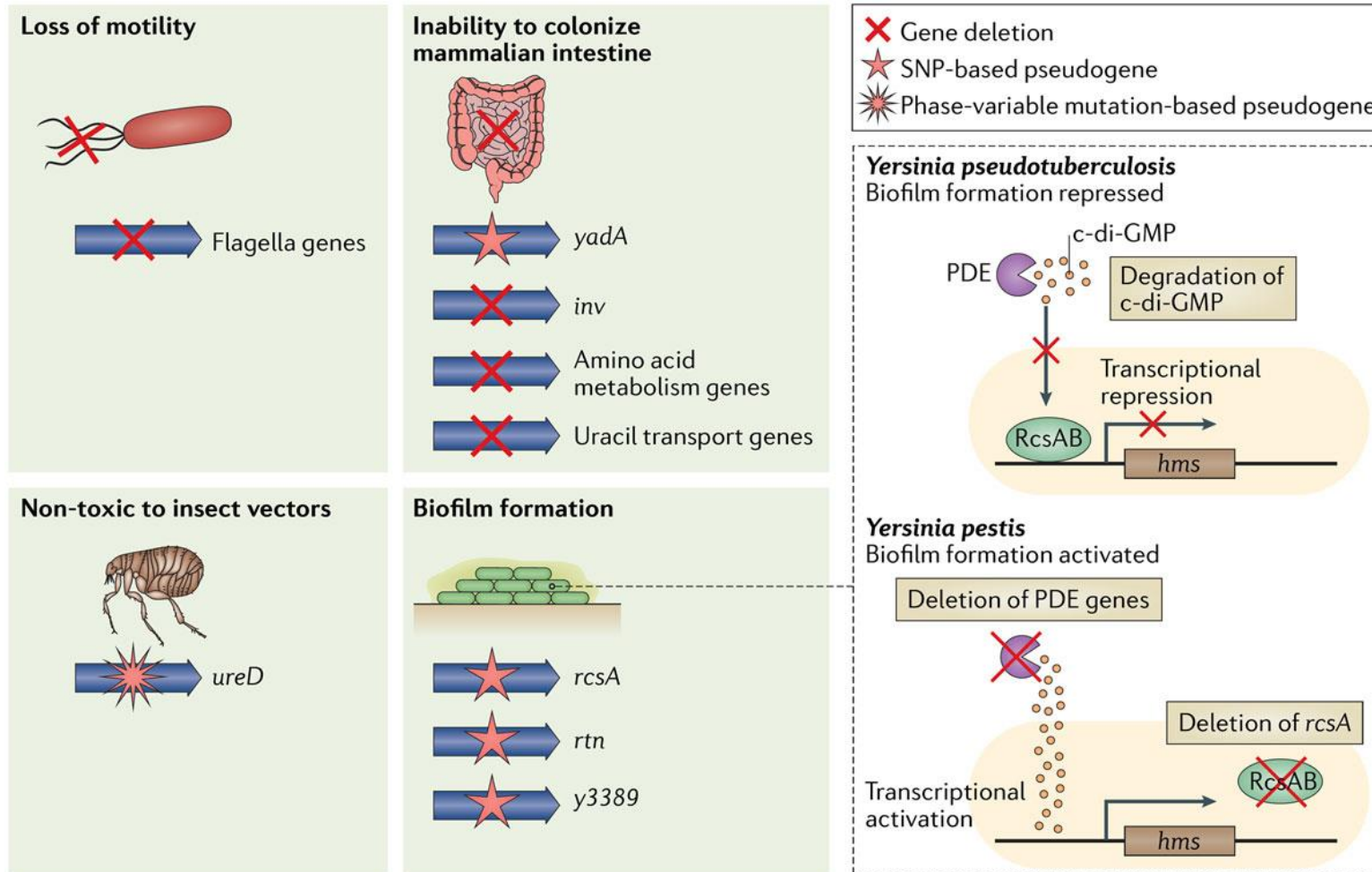
Quindi esacetilazione è una tappa essenziale per scatenare la risposta dell'ospite.

La perdita del gene *lpxL* è quindi essenziale per *Y. pestis* per eludere i sistemi di difesa dell'ospite.

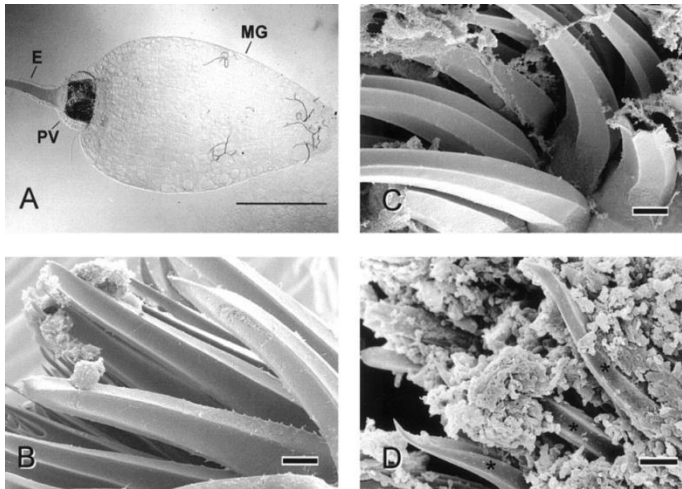
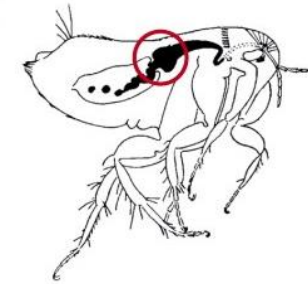
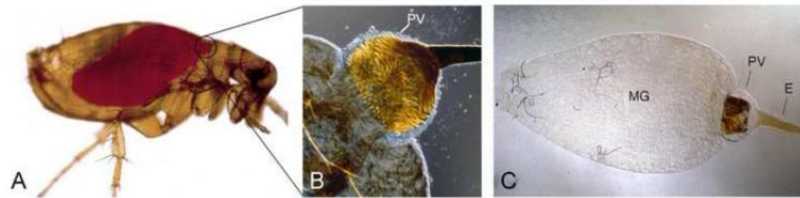
Molti dei geni che sono stati funzionalmente persi nell'evoluzione da *Y. pseudotuberculosis* a *Y. pestis* codificano fattori di virulenza come le invasine e Yad A e loci metabolici che sono coinvolti nel metabolismo degli aminoacidi dicarbossilici e nel trasporto di uracile o loci coinvolti nella motilità.

Y. pseudo richiede questi loci per un'efficiente colonizzazione del tratto gastrointestinale che è una nicchia non più colonizzata da *Y. pestis* che deve invece colonizzare intestino della pulce e nei mammiferi per poi poter essere in grado di provocare un'infezione sistemica.

Ruolo della perdita dei geni nell'evoluzione di *Y. pestis* da *Y. pseudotuberculosis*



Analisi dell'importanza del passaggio nella pulce per la trasmissione



Tratto digerente della pulce: esofago, proventriculus, intestino medio e intestino posteriore

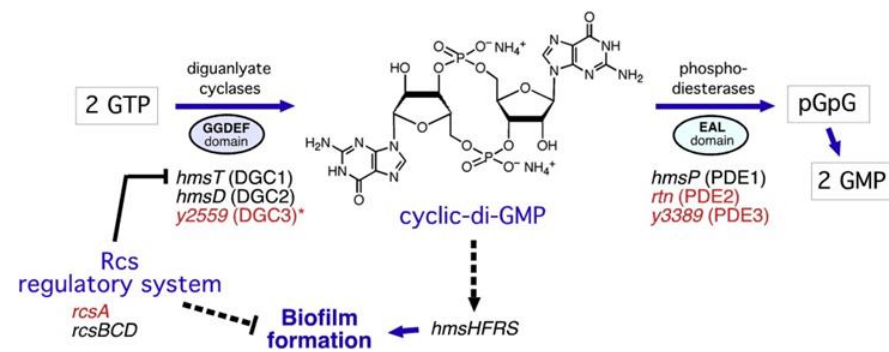
Modello del blocco proventricolare: si formano degli aggregati di *Y. pestis* prima all'interno dell'intestino medio e poi nel proventriculus.

Adattamento alla pulce

Mutazioni in *rcaA* alleviano la repressione trascrizionale sul operone dello stoccaggio dell'emina (*hms*) che codifica fattori necessari per la formazine dei biofilm.

Incremento dei livelli di formazione di biofilm di GMP-dipendente.

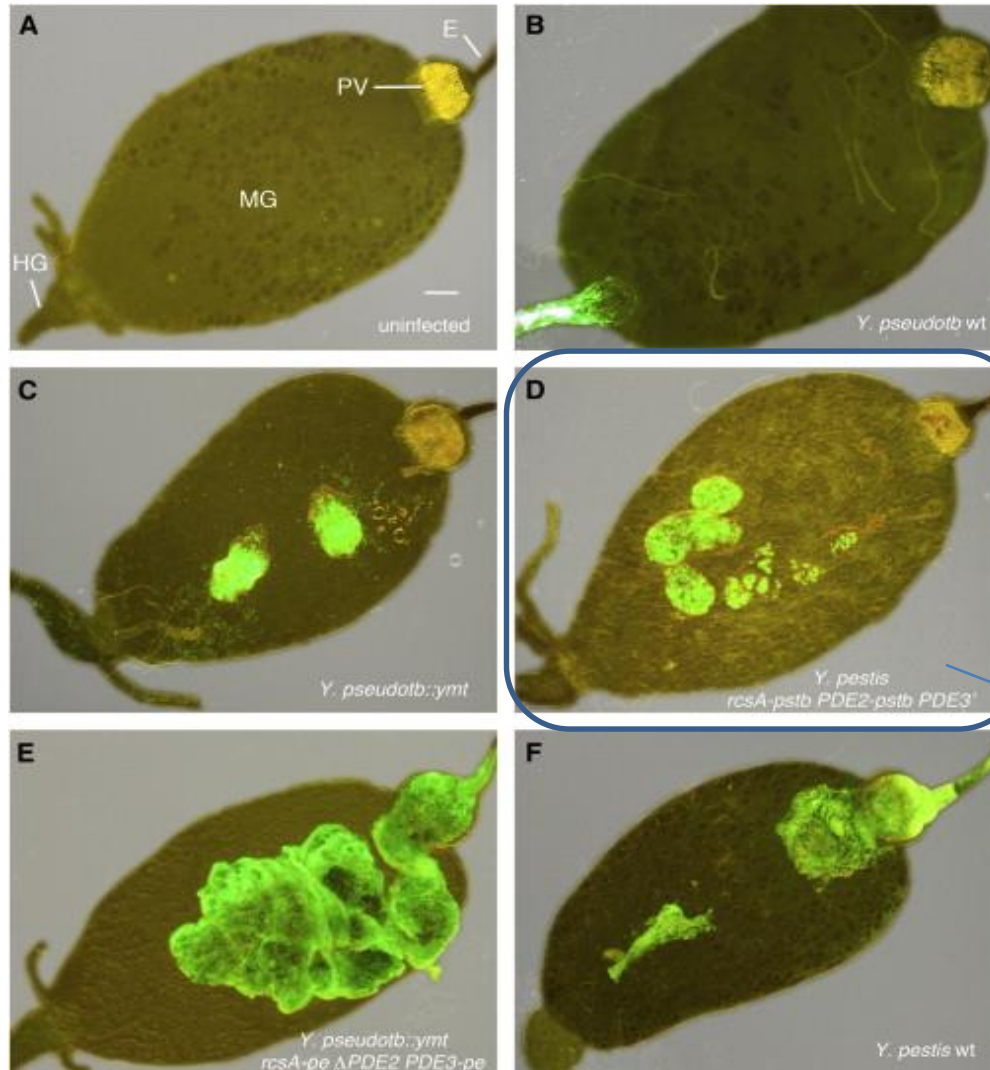
Le mutazioni identificate sono localizzate in due geni che codificano fosfodiesterasi (*rtn* e *y3389*) che sono enzimi che degradano il cyclic –di-GMP),una molecola che agisce come attivatore di *hms* e quindi della formazione di biofilm



Cyclic-di-GMP: molecola segnale che induce la formazione del biofilm

In *Y. pseudotuberculosis* ci sono tre diguanilato ciclasti (DCG) che sintetizzano cyclic-di-GMP e tre fosfodiesterasi (PDE) che la degradano.

In *Y. pestis* due dei tre PDE sono presenti come pseudogeni: la perdita di funzione di *rcsA* e dei due PDE ha l'effetto di aumentare la concentrazione intracellulare di cyclic-di-GMP, favorendo la sintesi del biofilm



La sostituzione dei tre pseudogeni con gli omologhi funzionali di *Y. pseudotuberculosis* elimina completamente la capacità di *Y. pestis* formare il biofilm